

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MUTANTES  
DOMINANTES INHIBITORIOS H-Ras N17, K-Ras N17 Y N-Ras N-17**

UNIVERSIDAD AUTONOMA MADRID  
REGISTRO GENERAL

Entrada 01 Nº. 200300014207  
03/10/03 11:07:27

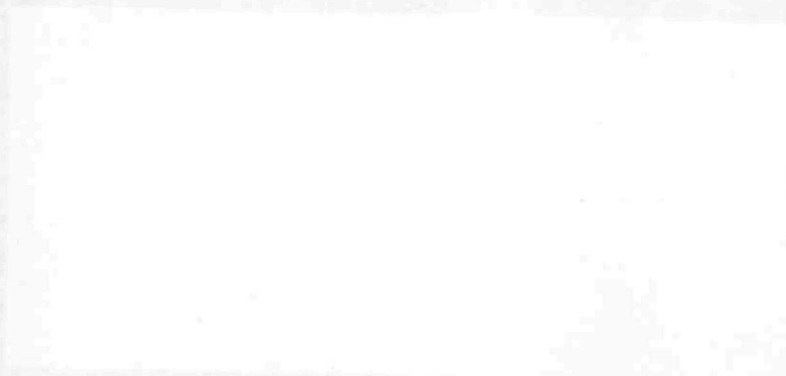
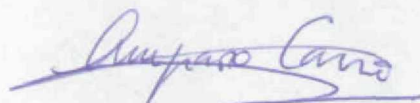
**TESIS DOCTORAL**

**DAVID GÓMEZ MATALLANAS**

**Madrid, 2003**

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la  
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral  
con la censura de SOBRESALIENTE CUM LAUDE

Madrid, 28 de Noviembre de 2003





M  
TESIS  
2474

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MUTANTES  
DOMINANTES INHIBITORIOS H-Ras N17, K-Ras N17 Y N-Ras N-17**



Memoria presentada por DAVID GÓMEZ MATALLANAS, licenciado en Biología,

Para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Director de la Tesis: Piero Crespo Baraja

Tutor: Carmela Calés Bourdet

R.F.M. 23626

Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC-UAM

Madrid, 2003

Piero Crespo Baraja. Doctor en Ciencias Biológicas y Científico Titular del  
Instituto de Investigaciones Biomédicas del C.S.I.C,

CERTIFICA QUE: David Gómez Matallanas, Licenciado en Biología por la  
Universidad de Alcalá de Henares, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado:

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MUTANTES  
DOMINANTES INHIBITORIOS H-Ras N17, K-Ras N17 Y N-Ras N-17**

El cual considero satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en  
el departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y Para que así conste donde proceda, expido el presente certificado en Madrid a  
26 de septiembre de 2003



Fdo: Piero Crespo Baraja

El presente trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM (Madrid) bajo la dirección de Piero Crespo Baraja (Científico Titular del CSIC), con la tutoría de Carmela Calés Bourdet (Profesora Titular UAM).



## RESUMEN

La familia Ras GTPasas incluye las isoformas H-Ras, K-Ras y N-Ras. A pesar de sus grandes similitudes bioquímicas y biológicas, en los últimos años se han acumulado un gran número de evidencias que apuntan a que estas proteínas no son funcionalmente redundantes. Una de las estrategias más extendidas para esta familia de GTPasas es la utilización de los mutantes dominantes inhibitorios de Ras, que son capaces de bloquear específicamente la activación de sus respectivas proteínas salvajes. Así, H-Ras N17 ha demostrado ser un reactivo extremadamente útil para estudiar las funciones de Ras. A pesar de lo extendido de su utilización, hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio comparativo de las especificidades inhibitorias los mutantes H-Ras N17, K-Ras N17 y N-Ras N17. En este trabajo demostramos que los mutantes H-, K- y N-Ras N17 presentan marcadas diferencias en sus especificidades inhibitorias con respecto a H-, K- y N-Ras. H-Ras N 17 es capaz de inhibir la activación de las tres isoformas de Ras. K-Ras N17 inhibe completamente la activación de K-Ras y ligeramente la de H-Ras. N-Ras N 17 inhibe principalmente a N-Ras. A la luz de descubrimientos recientes, que apuntan a que las proteínas H-Ras y K-Ras están compartimentalizadas en distintos microdominios membrana plasmática, hemos realizado el primer estudio de la microlocalización celular de N-Ras. En conjunto, nuestros resultados indican que la especificidad inhibitoria de los mutantes Ras N17, está relacionado con la localización de las distintas isoformas de Ras en diferentes microdominios de membrana.

## SUMMARY

Ras GTPases include the isoforms H-Ras, K-Ras and N-Ras. Despite their great biochemical and biological similarities, evidence is mounting suggesting that Ras proteins may not be functionally redundant. A widespread strategy for studying small GTPases is the utilization of dominant inhibitory mutants that specifically block the activation of their respective wild-type proteins. As such, H-Ras N17 has proved to be extremely valuable as a tool to probe Ras functions. However, a comparative study on the inhibitory specificities of H-, K- and N-Ras N17 mutants has not been approached thus far. Herein, we demonstrate that H-, K- and N-Ras N17 mutants exhibit markedly distinct inhibitory effects towards H-, K-, and N-Ras. H-Ras N17 can effectively inhibit the activation of all three isoforms. K-Ras N17 completely blocks the activation of K-Ras and is only slightly inhibitory on H-Ras. And N-Ras N17 can mainly inhibit N-Ras activation. In light of the recent data on the compartmentalization of H-Ras and K-Ras in the plasma membrane, here we present for the first time a description of N-Ras cellular microlocalization. Overall, our results on Ras N17 mutants specificities exhibit a marked correlation with the localization of the Ras isoforms to distinct membrane microdomains.



## ÍNDICE

<b><u>ÍNDICE</u></b>	
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>I</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b><u>1.1 PROTEÍNAS DE LA FAMILIA Ras</u></b>	<b>1</b>
1.1.1 GENES <i>ras</i> EN MAMÍFEROS	2
1.1.1.1 ESTRUCTURA	2
1.1.1.2 EXPRESIÓN GÉNICA	2
1.1.2 PROTEÍNAS Ras	3
1.1.2.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN	3
1.1.2.2 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES	5
1.1.3 FACTORES DE INTERCAMBIO DE NUCLEÓTIDOS	7
1.1.3.1 ESTRUCTURA DE LOS EFs	7
1.1.3.2 MECANISMO GENERAL DE ACCIÓN	8
1.1.3.3 FACTORES DE INTERCAMBIO DE LA FAMILIA Ras	8
1.1.4 MUTANTES DOMINANTES INHIBITORIOS Ras N17	11
1.1.5 RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES ACTIVADAS POR LAS PROTEÍNAS Ras	12
1.1.5.1 Raf Y LA RUTA MEK/ERK.	14
1.1.5.2 FAMILIA RalGDS Y LA RUTA DE LA GTPasa Ral	14
1.1.5.3 RUTA DE LA PI3K	15
1.1.5.4 FOSFOLIPASA C $\epsilon$	16
1.1.6 DIFERENCIAS FUNCIONALES ENTRE H-, K- Y N-Ras	17
<b><u>1.2 MEMBRANA PLASMÁTICA</u></b>	<b>18</b>
1.2.1 COMPONENTES LIPÍDICOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA	18
1.2.2 ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA	19
<b><u>1.3 COMPARTIMENTALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS Ras</u></b>	<b>23</b>
1.3.1 LOCALIZACIÓN DE Ras EN MICRODOMINIOS DE	

MEMBRANA	24
1.3.2 LOCALIZACIÓN DE Ras EN ENDOMEMBRANAS	25
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
<b><u>MATERIALES</u></b>	<b>28</b>
<b><u>3.1 PRODUCTOS</u></b>	<b>28</b>
3.1.1 Reactivos químicos	28
3.1.2 Productos de Biología Molecular	28
3.1.3 Material radiactivo	28
<b><u>3.2. CULTIVOS CELULARES</u></b>	<b>28</b>
3.2.1 Material de cultivos celulares	28
3.2.2 Factores de crecimiento	28
3.2.4 Líneas celulares	29
<b><u>3.3 ANTICUERPOS</u></b>	<b>29</b>
3.3.1 Anticuerpos primarios	29
3.3.2 Anticuerpos secundarios	29
<b><u>3.4 CEPAS BACTERIANAS</u></b>	<b>30</b>
<b><u>3.5 PLÁSMIDOS</u></b>	<b>30</b>
3.5.1 Vectores	30
3.5.2 Vectores de expresión en células de mamíferos	31
3.5.3 Vectores que producen proteínas de fusión en bacterias	35
<b><u>MÉTODOS</u></b>	<b>36</b>
<b><u>3.6 TÉCNICAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</u></b>	<b>36</b>
<b><u>3.7 EXTRACCIÓN DEL ADN PLASMÍDICO</u></b>	<b>36</b>

<u>3.8. CULTIVOS CELULARES</u>	37
<u>3.9 TRANSFECCIONES TRANSITORIAS DE CÉLULAS COS-7</u>	
<u>NIH-3T3, MDCK Y MEF</u>	37
<u>3.10 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS</u>	37
3.10.1 Extracción de proteínas celulares y análisis por <i>western blot</i>	38
3.10.2 Fraccionamiento subcelular	40
3.10.3 Fraccionamiento de proteínas de membrana en gradientes de sacarosa	40
<u>3.11 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE PROTEÍNAS</u>	40
3.11.1 Ensayos de actividad MAPK	41
3.11.2 Obtención de proteínas recombinantes para los ensayos de unión de proteínas <i>in vitro</i>	42
3.11.3 Ensayo por pull down del intercambio de nucleótidos	43
<u>3.12 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA</u>	44
 <b>4. RESULTADOS</b>	
<u>4.1 COMPARACIÓN DEL POTENCIAL INHIBITORIO DE LOS MUTANTES</u>	
<u>H-, K- y N-Ras N17.</u>	45
4.1.1 Inhibición de la activación de ERK2 dependiente de la concentración de los mutantes dominantes inhibitorios	45
4.1.2 La inhibición de ERK2 por los mutantes H-, K- y N-Ras N17 es rescatada por la sobreexpresión de la proteína Ras salvaje	47
<u>4.2 ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD INHIBITORIA DE LOS MUTANTES</u>	
<u>H-, K- Y N-Ras N17</u>	48
4.2.1 Rescate de la inhibición de los mutantes dominantes	



inhibitorios por isoformas de Ras heterólogas	48
4.2.2 Estudio del papel de la señal de anclaje a membrana en la especificidad inhibitoria de H-, K- y N-Ras N17	51
4.2.3 Efecto de los mutantes dominantes inhibitorios de Ras sobre el intercambio de nucleótidos en las tres isoformas de Ras	54
4.2.4 Efecto de H-N17, K-N17 y N-N17 sobre la activación de ERK2 por EGF en fibroblastos embrionarios de ratón N-ras -/-	54
<b><u>4.3 PAPEL DE LA SUBLOCALIZACIÓN DE RAS EN DOMINIOS DE MEMBRANA EN LA ESPECIFICIDAD DE LOS MUTANTES DOMINANTES INHIBITORIO</u></b>	56
4.3.1 Estudio de la localización de N-Ras en la membrana plasmática	56
4.3.2 Estudio de la localización de N-RAS	56
<b><u>4.4 EFECTO DE LOS MUTANTES Ras N17 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE ERK2 INDUCIDA POR ESTÍMULOS MITOGÉNICOS Y EFs DE RAS</u></b>	61
4.4.1 Efecto de los mutantes dominantes inhibitorios sobre la activación de ERK2 mediada por estímulos mitogénicos	61
4.4.2 Efecto de H-,K- Y N17 sobre la activación de ERK2 mediada por factores intercambiadores de nucleótidos de Ras	61
4.4.3 Estudio de la capacidad de intercambio de nucleótidos en las tres proteínas Ras mediado por distintos factores de intercambio de nucleótidos.	64
<b>5. DISCUSIÓN</b>	65
<b>6. CONCLUSIONES</b>	73

<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>74</b>
<b>8. ANEXO PUBLICACIONES</b>	<b>88</b>

## **ABREVIATURAS**

**ABREVIATURAS**

ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CMV	citomegalovirus
DAG	Diacilglicerol
DEAE	Dietilaminoetil
DH	Dominio de homología a Dbl
DMEM	Medio de cultivo EAGLE modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	1-4 ditiotreitól
ECL	Quimioluminiscencia modificada
EDTA	N´N´N´-etilen diamino tetraacetato disódico
EGF	Factor de crecimiento epitelial
EGTA	Etilén glicol bis(amino etil-éter)
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular
GAP	Proteínas activadoras de la actividad GTPasa
GDP	Nucleótido difosfato de guanina
GDS	Estimulador de la disociación de nucleótidos de guanina
GEF o EF	Factor de intercambio de nucleótidos
GFP	Proteína verde fluorescente
GRP	Guanin releasing protein (= CAL-DAG)
GST	Glutation-S-Transferasa
GTP	Nucleótido trifosfato de guanina
GTPasa	Guanidina trifosfatasas
HA	Hemaglutinina
HEPES	Ácido N-(-2-hidroxietil) piperazin-N´-(3 propanosulfónico)
HVR	Región hipervariable de Ras
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton



LB	medio Lurina Bertani
LPA	Ácido lisofosfatídico
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MBP	Proteína básica de mielina
MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón
MEK	Mitogen-activated protein/extracelular signal-regulated kinase kinase
MLB	Magnesium-containing lysis buffer o tampón de lisis con magnesio
NP-40	Nonidet-40
P100	Fracción particular
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PH	Dominio de homología a Pleckstrina
PI3K	Fosfatidil-inositol-3-quinasa
PLC-ε	Fosfolipasa C epsilom
Raf-RBD	dominio de unión a Ras de Raf
Ras-GRF	Ras-guanine nucleotide releasing factor
RE o ER	Retículo endoplasmático
REM	Ras exchange motif
RNAsa	Ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
S100	Fracción soluble
SDS	dodecil sulfato sódico
SH2	Dominio 2 de homología a Src
SH3	Dominio 3 de homología a Src
Sos	Son of sevenless
Tris	Tri(hidroxil) metano
TTBS	Tris buffered saline-Twenn
WB	Western blot
wt	wild type o forma salvaje de una proteína

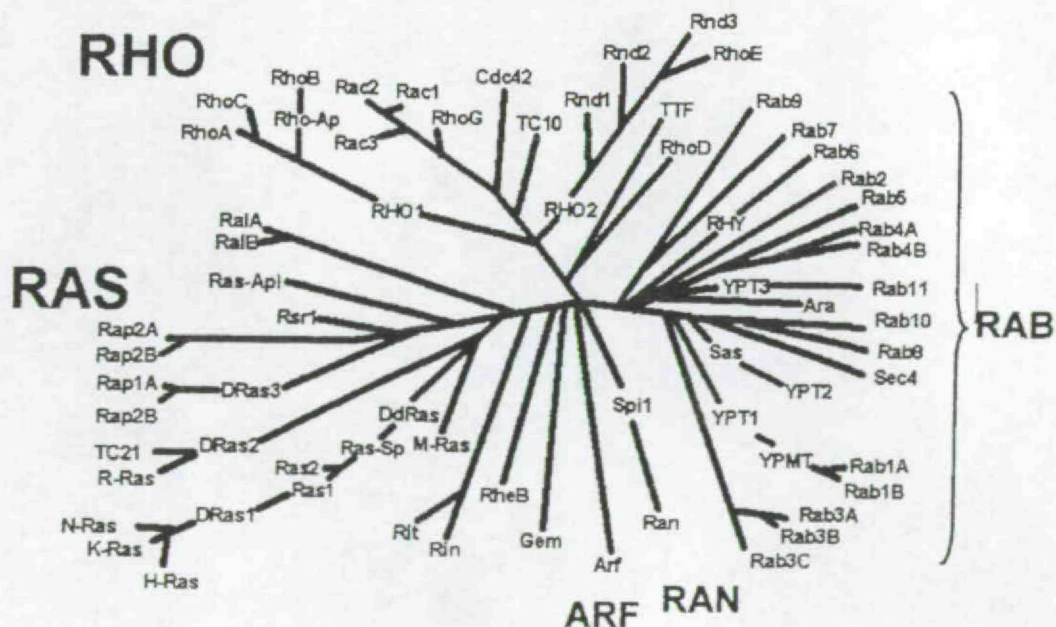
## **1. INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 PROTEÍNAS DE LA FAMILIA Ras.

Las proteínas de la familia Ras forman parte de la superfamilia de GTPasas Ras que, en mamíferos, está formada por más de 60 miembros. Todos los miembros de esta familia son proteínas G monoméricas de 20-25 kDa capaces de unir nucleótidos de guanina y todos mantienen un alto grado de homología estructural y funcional, actuando como interruptores moleculares en múltiples rutas de transducción de señales. En virtud de su estructura y función actualmente se clasifican en seis familias representadas por las proteínas Ras, Rho, Rab, Ran, Rad y Arf (Malumbres et al.1998, Crespo y León 2000).

La familia Ras se divide a su vez en función de la homología de su dominio efector en las subfamilias: Rap (Rap-1A, Rap-1B, Rap-2A y Rap-2B), R-Ras (R-Ras, TC21/R-Ras2, y R-Ras3), Ral (RalA y RalB), Rheb, M-Ras y la subfamilia Ras que incluye a H-Ras, K-Ras A, K-Ras B, y N-Ras (Crespo y León 2000)



**Figura 1.** Dendrograma por homología de secuencia de las proteínas de la familia Ras.



## **1.1.1 GENES *ras* EN MAMÍFEROS**

### **1.1.1.1 ESTRUCTURA**

Los genes *ras* aparecen altamente conservados a lo largo de la evolución de los organismos eucariotas. En mamíferos existen tres genes *H-ras*, *K-ras* y *N-ras* que presentan una homología del 80% (Barbacid 1987). Los tres genes están formados por cuatro exones codificantes y un exón 5' no codificante (exón  $\phi$ ) y se diferencian considerablemente en los tamaños y secuencias de sus intrones. En humanos el locus de *H-ras* tiene una longitud de 3 kb, *N-ras* mide 7 kb y *K-ras* ocupa mas de 35 kb. Los tres genes aparecen localizados en distintos cromosomas. El gen *K-ras* es particular, porque presenta dos cuartos exones codificantes (4A y 4B), que dan lugar a dos isoformas de splicing alternativo K-RasA y K-Ras B que se diferencian entre sí en los 25 aminoácidos de su extremos carboxilo terminal (Barbacid 1987; Lowy y Willumsen 1993).

En todos los mamíferos estudiados hasta el momento aparecen presentes los tres genes *ras*, manteniendo un alto grado de conservación, lo que sugiere que las duplicaciones que han dado lugar a la aparición de los tres genes *ras* tuvieron lugar antes de la radiación evolutiva de los mamíferos (Barbacid 1987).

### **1.1.1.2 EXPRESIÓN GÉNICA**

Los tres genes *ras* presentan promotores ricos en GC, carentes de motivo TATA, lo que es característico de genes house-keeping. Algunos elementos reguladores de la expresión de *ras* se encuentran localizados en la región 5' del gen y en el primer intrón de los tres genes (Paciucci y Pellicer 1991; Jeffers y Pellicer 1994). Existen otros elementos que regulan la expresión de H-Ras en el extremo 3' (Lowy y Willumsen 1993). Los genes *ras* de mamíferos aparecen expresados en todos los tipos celulares y órganos, aunque los



niveles relativos de cada isoforma varían a lo largo del desarrollo embrionario y en distintos tejidos adultos (León et al. 1987), pero en cualquier caso siempre se observa expresión de todas las isoformas.

Hoy en día parece estar claro que los niveles de ARNm de *ras* son relativamente constantes en la célula. Aunque la expresión de los tres genes *ras* aparece ligeramente incrementada con la presencia de suero (Quincoces et al. 1995). También existe una regulación cruzada en la inducción transcripcional de los tres genes *ras* debida a la presencia de un elemento localizado en un área fuera del promotor (Quincoces et al. 1997). En el caso de N-*ras*, parece que el gen *unr*, situado justo upstream de este en el cromosoma, estaría ejerciendo una función de regulación negativa de la expresión de N-Ras (Boussadia et al. 1997). N-*ras* y *unr* forman un tandem de genes expresados ubicuamente y se ha comprobado que la expresión del gen *unr* disminuye los niveles de expresión del gen N-*ras*, ya que la delección del promotor del gen *unr* en células stem conlleva el aumento de los niveles de ARNm de N-*ras*.

### **1.1.2 PROTEÍNAS Ras.**

#### **1.1.2.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN**

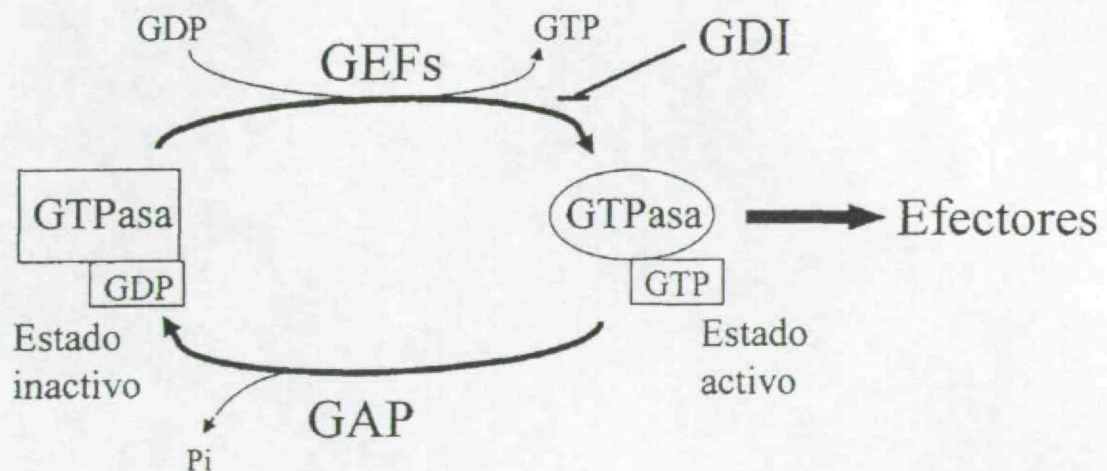
El producto codificado por los genes *ras* es una proteína de 188 aminoácidos (189 en el caso de K-RasB), con un peso molecular de aproximadamente 21 kDa. Las cuatro proteínas son altamente homologas en sus primeros 164 residuos, siendo idénticas en los primeros 86 aminoácidos amino terminales y con una semejanza de mas del 79% en los siguientes 78 residuos. Sin embargo, en los 25 residuos de su extremo carboxilo terminal difieren completamente, con la única excepción de la cisteína 186 que forma parte del motivo CAAX ( C, cisteína; A aminoácido alifático; X metionina o serina), por

esta razón a esta región se la denomina hipervariable (HVR) (Barbacid 1987; Hancock 2003).

La actividad biológica de Ras reside en una región a la que se ha denominado dominio efector (residuos 32-40), a través del cual se une a sus distintas moléculas efectoras. Además, se han identificado cinco segmentos no contiguos que parecen ser fundamentales para la función de ras: las regiones comprendidas entre los residuos 5-63, 77-92, 109-123, 139-165 y la caja CAAX. La función biológica de Ras está regulada por su paso del estado inactivo, unido a guanin dinucleótidos (GDP), y su estado activo, en el que aparece unido a guanin trinucleótidos (GTP). Este ciclo está estrictamente regulado por, al menos, dos tipos de proteínas:

- Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs): que catalizan el intercambio de GDP por GTP, con lo que la proteína queda en su conformación activada en la que se puede unir a sus moléculas efectoras.

- Proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), que potencian la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas Ras, acelerando la hidrólisis de GTP a GDP, lo que implica el paso al estado inactivo (Barbacid 1987).



**Figura 2.** Ciclo de activación/inactivación de las proteínas G pequeñas.



La estructura tridimensional de Ras sufre variaciones en función del nucleótido al que esté unida, lo que da una explicación funcional al ciclo de activación de estas GTPasas. Las proteínas Ras unen los nucleótidos de guanina con alta afinidad a través de cuatro motivos: residuos 10-18 (P-loop), implicados en la unión a los fosfatos  $\alpha$  y  $\beta$ ; residuos 57-63 implicados en la unión a magnesio y al fosfato  $\gamma$  en el estado activado; residuos 116-119 y 144-147 que están implicados en la unión del anillo de la guanina. Sin embargo, las diferencias estructurales entre el estado activado e inactivado están limitadas a dos lazos de la proteína conocidos como switch I (residuos 30-38), que es el dominio principal de unión a los efectores de Ras y la región de unión de las GAPs, y el dominio switch II (residuos 60-76) que es la región a la que se unen preferentemente los EFs (Ma et al, 1997). Los cambios conformacionales de estas regiones están implicados en la unión de las proteínas reguladoras del ciclo GTP/GDP y la unión a los efectores que median en la señal de Ras.

### **1.1.2.2 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES**

Las proteínas Ras son sintetizadas en ribosomas libres en el citoplasma y tiene una vida media de aproximadamente 24 horas (Ulsh et al 1984). Para ser funcionales estas proteínas deben asociarse a la cara interna de la membrana plasmática, para lo cual la proteína citosólica recién sintetizada debe sufrir un proceso de modificación lipídica. Los tres primeros pasos de esta modificación postraducciona l están dirigidos por la caja CAAX anteriormente mencionada y son comunes a todas las isoformas de la familia (Wilumsen et al. 1984; Casey et al. 1989). Inicialmente tiene lugar una farnesilación, en la que una farnesil transferasa citosólica, cataliza la unión de un grupo farnesilo (poliisoprenilo de 15 carbonos), a la cisteína 186 de dominio CAAX. A continuación, la proteína farnesilada se une a la capa citosólica del retículo endoplasmático (RE), donde



una endopeptidasa llamada Rce1, proteoliza los residuos AAX (Boyartchuk et al 1997; Otto et al. 1999). En tercer lugar el  $\alpha$ -carboxilo de la ahora cisteína terminal es metilado por la isoprenil-cistein metiltransferasa (Icmt) (Hrycyna et al 1991; Dai et al 1998). Estas modificaciones hacen que las proteínas Ras sean más hidrofóbicas por lo que presentan una mayor afinidad por la membrana plasmática. Sin embargo estas modificaciones no son suficientes para establecer una unión estable de las proteínas Ras con la membrana, sino que necesitan una segunda señal de unión. En el caso de K-rasB, esta segunda señal consiste en un dominio polibásico formado por seis lisinas en el extremo C-terminal, que le permiten establecer interacciones electrostáticas con los fosfolípidos de la membrana plasmática. Por su parte, H-Ras, K-RasA y N-Ras deben sufrir una segunda modificación lipídica, consistente en la unión de un grupo palmitilo en la cisteína 181 en el caso de N-Ras, K-Ras 4A, o en las cisteínas 181 y 184 de H-Ras. Esta reacción está mediada por RTP, una palmitiltransferasa residente en el RE (Lowi y willumsen 1993). Al contrario de lo que ocurre con la farnesilación, la palmitolización es reversible, de manera que la unión del palmitilo a N-Ras tiene una vida media de aproximadamente 20 minutos y de una hora en el caso de H-Ras (Magee et al. 1987). Una vez que han perdido la modificación estas proteínas pueden volver a ser palmitiladas, de hecho se piensa que existe una palmitiltransferasa en la membrana plasmática ya que, se ha comprobado que cuando se inhibe la vía exocítica, N-Ras sigue localizado en la membrana, lo que sugiere que esta isoforma está siendo continuamente repalmitilada en la membrana (Schroeder et al. 1987).

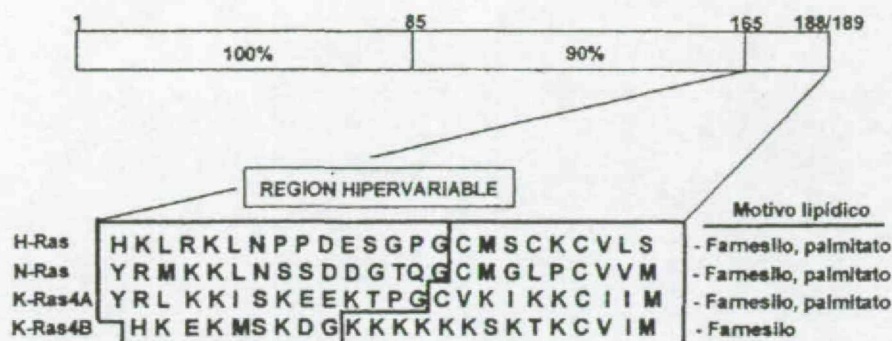


Figura 3. Regiones hipervariables de las proteínas Ras y sus modificaciones postraduccionales.

Una vez producidas estas modificaciones, las proteínas Ras son transportadas por distintas rutas a sus distintas ubicaciones en la membrana plasmática. En el caso de H-Ras, N-Ras y K-RasA, entran en la ruta exocítica y se transportan hasta la membrana pasando por el aparato de Golgi por otro lado. Por otro lado K-RasB sigue una ruta alternativa, que no incluye el paso por el aparato de Golgi. Este mecanismo de transporte no ha sido caracterizado todavía, aunque hay indicios de que podría estar relacionado con la unión de K-RasB a microtúbulos (Prior y Hancock 2002; Wolfman 2001)

1.1.3 FACTORES DE INTERCAMBIO DE NUCLEÓTIDOS

1.1.3.1 ESTRUCTURA DE LOS EFs

Por regla general, los EFs son moléculas de gran tamaño, estructuradas en módulos de distinta naturaleza, que determinan, tanto su especificidad de sustrato, como los mecanismos que regulan la activación e inactivación de los EFs, procesos regulados por la interacción de los dominios estructurales con moléculas de diversa naturaleza: dominios del mismo EF, otras proteínas, segundos mensajeros, cationes etc.

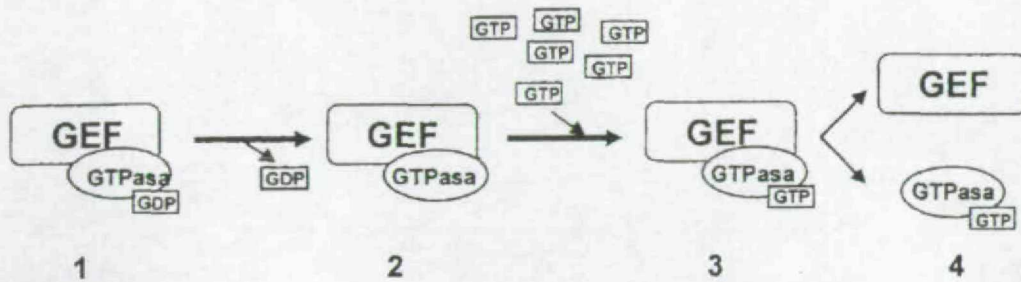
En la tabla 1, se recogen los dominios más comunes en los EF de la familia Ras, haciendo referencia a su naturaleza y función.



### 1.1.3.2 MECANISMO GENERAL DE ACCIÓN

Los EFs catalizan la reacción por la cual las GTPasas liberan nucleótidos difosfato de guanina (GDP) y pasan a unir nucleótidos trifosfato (GTP). Esta activación de la proteína G pequeña se da en respuesta a estímulos de diversa naturaleza y se desarrolla en varias etapas.

1. El EF forma un complejo de unión muy estable con la GTPasa unida a GDP.
2. El nucleótido difosfato se disocia del complejo, que pasa a ser un complejo binario muy estable, formado por el EF y la GTPasa libre de nucleótido.
3. *In vivo*, el complejo GTPasa-EF se puede considerar inexistente. La alta proporción de GTP respecto a GDP existente en la célula (una relación 10:1), hace que la GTPasa una rápidamente el nucleótido trifosfato.
4. El factor de intercambio se separa de la GTPasa, finalizando la reacción.



**Figura 4.** Reacción de activación de GTPasas por EFs.

En este sentido los EFs tendrían una doble función bioquímica: desestabilizar la fuerte unión GTPasa-GDP y estabilizar a la proteína G pequeña en el estado libre de nucleótido (Chefils y Chardin 1999)

**Tabla 1.** Dominios más comunes de los factores de intercambio.

### 1.1.3.3 FACTORES DE INTERCAMBIO DE LA FAMILIA Ras

La principal característica de los EFs para las proteína de la familia Ras, es la presencia en su secuencia de un dominio con homología a la proteína CDC25, EF de



RAS en levaduras (Jones et al 1991). Prácticamente todos los EF para GTPasas de la familia Ras se han clonado en virtud de su homología a esta proteína. En un principio se determinó la región mínima funcional de la proteína CDC25 de levaduras en un fragmento de 250 residuos, el “core” del dominio catalítico, suficiente para inducir intercambio en Ras (Lai et al 1993), sin embargo se ha comprobado *in vivo* que es necesaria una proteína mayor de alrededor de 450 aminoácidos. Esta región contiene una secuencia de unos 50 residuos en posición aminoterminal a CDC25 a la que se ha denominado REM (Ras Exchange Motif), que estabiliza el “core” del dominio catalítico (Sjodin et al. 1998).

<i>DOMINIOS CATALÍTICOS</i>	EF	Homología	Tamaño	Función
Dominio Cdc25	Todos los de Ras	Gen CDC25 <i>S. Cerevisiae</i>	250 aa	Cataliza el intercambio de nucleótidos
Dominio DH	RasGRF1-2 y SOS1-2	Dbl EF de Rho	Tres regiones CR de 10-20 aa	Intercambio de Nucleótidos EF de Rho
<i>DOMINIOS REGULADORES</i>				
Dominio PH	Todos los de Ras	Pleckstrina	120 aa	Unión fosoinositidos, anclaje a membrana
Secuencias REM	Todos los de Ras		50 aa	Estabilización del “core” de Cdc25
Dominio IQ	RasGRF1-2	Ilimaquinona		Unión a calmodulina, activan flujos de Ca
Motivos “CDB-like”	RasGRF1-2	Sec. Tipo cyclin destruction box	RXALGXIXN	Secuencias de ubiquitinización, para degradación
Secuencias PEST	RasGRF1-2		Secuencias ricas en prolina, ac. Glutámico, Serina, treonina	Secuencias de ubiquitinización, para degradación

**Tabla 1.** Dominios más comunes de los factores de intercambio.

La unión del EF a Ras se produce a través de las regiones switch I (residuos 67-71), y la hélice 3 (residuos 102-107). Al producirse la unión, la región switch I se desplaza dando lugar a la apertura del bolsillo de unión al nucleótido de Ras (Quilliam et al 1995).

### **Ras GRF1 y 2**

Aislados en la década de los 90 (Martegani et al 1992; Chen et al 1993), RasGRF1 y 2 son proteínas de alto peso molecular (140 y 135 kDa respectivamente), con una homología de más del 75% (Fam et al 1997) y presentan una estructura similar. Ras-GRF1 se expresa fundamentalmente en distintas áreas del Sistema Nervioso Central (SNC), como hipocampo, núcleos profundos o neocorteza (Sturani et al 1997), mientras que la expresión de Ras-GRF2 es más ubicua, apareciendo en SNC y pulmón (Fam et al 1997). Mientras que Ras-GRF2 es capaz de inducir intercambio de nucleótidos en las tres isoformas de Ras (de Hoog 2000), Ras-GRF1 presenta especificidad por H-Ras (Jones y Jackson 1997)

### **SOS 1 y 2**

Identificadas como homólogas de CDC25 en eucariotas superiores (Bonfini et al 1992), ambas isoformas presentan una estructura parecida (Botwell et al 1992). SOS1 se expresa ubicuamente y parece ser el EF de Ras más utilizado. SOS es capaz de activar a las tres isoformas de Ras. Estos factores de intercambio se activan principalmente por receptores tirosina-quinasa en respuesta a distintos estímulos (Bonfini et al 1992). Pero también varios estudios han demostrado que SOS1 se activa también a través de integrinas y receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (Pierce et al 2001)

### **Familia CAL-DAG/GRP**

Una característica general de los EF de esta familia es la presencia en su estructura de motivos de unión a calcio y a diacilglicerol (DAG) en posición



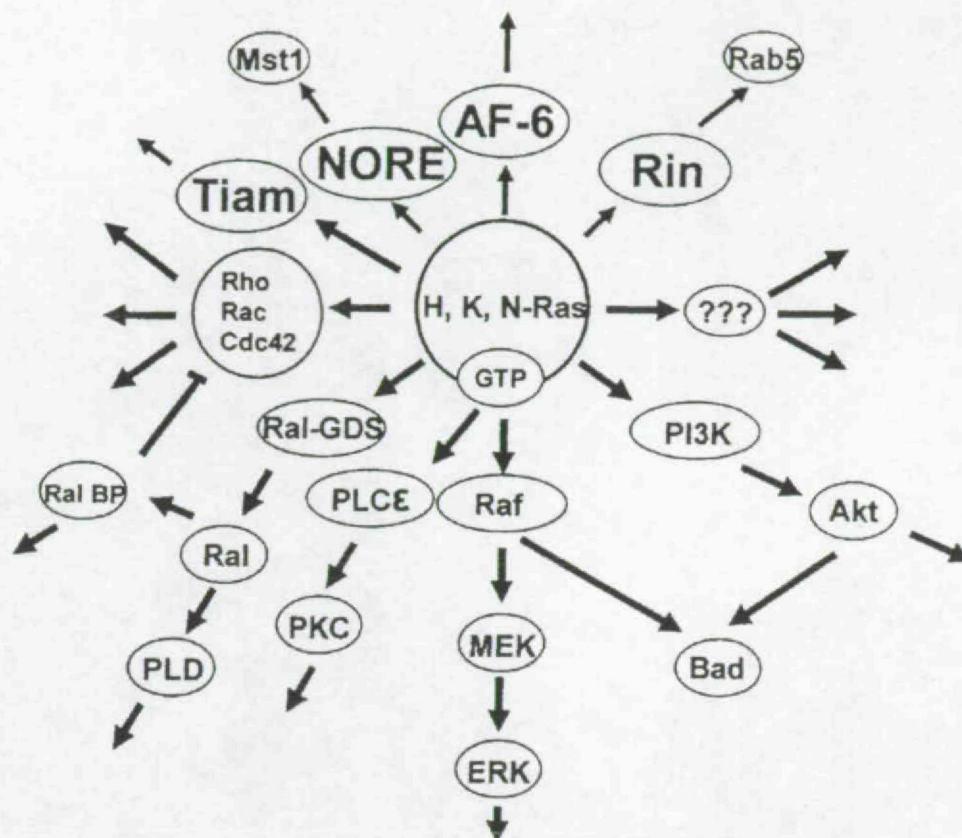
carboxiloterminar al dominio Cdc25 (Ebinu et al 1998). De esta familia sólo, CAL-DAG II y I son capaces de activar proteínas de la familia Ras. CAL-DAG II activa a H-Ras además de a R-Ras y TC21, mientras que CAL-DAG III actúa sobre N- y K-Ras, así como sobre Rap-1, R-Ras y TC21. Ambos EF son activados por unión a ésteres de forbol y a través de elevaciones intracelulares de calcio (Ohba et al 2000; Tognon et al 1998; Kawasaki et al 1998). Por último CAL-DAG I sólo activa Rap-1 y es incapaz de activar a ninguna de las tres isoformas de Ras. (Clyde-Smith et al. 2000)

#### **1.1.4 MUTANTES DOMINANTES INHIBITORIOS Ras N17.**

El mutante dominante inhibitorio H-Ras N17 fue obtenido por mutagénesis al azar (Feig et al 1988). Este mutante presentaba una sustitución de la asparagina 17 por una serina. La asparagina está situada en una región muy conservada en todas las proteínas G que forma parte del bolsillo de unión a GDP/GTP. Como resultado de la mutación esta proteína presenta una menor afinidad por GTP de aproximadamente 40 veces menos que la proteína salvaje. H-Ras N17 es capaz de detener el crecimiento de células NIH3T3 (Quilliam 1994), bloqueando aparentemente la actividad del H-Ras endógena. H-Ras N17 puede unir GTP aunque esta unión no impide que siga actuando como inhibidor de Ras, ya que son incapaces de unirse a sus efectores, aparentemente este comportamiento se debe a que la mutación impide la unión correcta del ion  $Mg^{2+}$  (Fansworth y Faig 1991). La inhibición producida por este mutante es reversible, ya que niveles de expresión de tres veces mayores de la proteína Ras salvaje con respecto a la proteína mutante son suficientes para rescatar el efecto inhibitorio del mutante. Esto es debido a que este mutante impide la unión de la proteína Ras endógena unida a GTP con sus EFs, por lo que no existe intercambio de nucleótidos y la proteína Ras no se activa (Stacey et al 1991). Esto se debe a que H-Ras N17 presenta una mayor afinidad por los EFs que la proteína salvaje por lo que, cuando se expresan a concentraciones suficientemente altas,



son capaces de secuestrar a los EFs de la célula impidiendo la activación de Ras e inhibiendo su función.



**Figura 5.** Efectores de H-, K- y Ras

Este mutante se ha convertido en una herramienta muy útil para estudiar los efectos mediados por las proteínas de la familia Ras, ya que no interfiere con los efectores de estas proteínas produciendo inhibiciones inespecíficas, y se expresa muy bien en cultivos celulares. Hasta la fecha no se han caracterizado los mutantes N17 de K- y N-Ras.

### 1.1.5 RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES ACTIVADAS POR LAS PROTEÍNAS Ras

Las proteínas Ras son un punto de convergencia de múltiples rutas de transducción de señales de activadas por distintos estímulos extracelulares como citoquinas, factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores. Estas moléculas se

acoplan a distintos tipos de receptores que incluyen receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca (p.ej. receptor del factor de crecimiento epidérmico), receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (p.ej. receptores muscarínicos), y receptores inertes, asociados a tirosina quinasas Src-like (p.ej. receptores de linfoquinas). La ruta de activación de Ras mejor caracterizada es la iniciada por receptores tirosina quinasa, que una vez activados por la unión, de su ligando se autofosforilan en ciertos residuos de tirosina en su dominio citoplásmico, lo que crea sitios de unión para dominios SH2 (Src homology domains), presentes en distintas proteínas como Grb2, Shc, PI3K, fosfolipasa C  $\gamma$ , y P120-GAP. Tanto Grb2 como Shc son capaces de activar a Ras a través de una unión directa con el factor de intercambio SOS al cual activan ubicándolo en la membrana.

Ras, una vez activada, es capaz de unirse a distintas moléculas efectoras transmitiendo así la señal hacia el interior de la célula a través de distintas rutas. Para que una proteína sea considerada efectora de Ras debe cumplir tres requisitos (Malumbres y Pellicer 1998):

- 1-Debe unirse preferentemente a Ras activado unido a GTP
- 2-Debe unirse a Ras a través del dominio efector, esta unión tiene que producir la activación del efector y desencadenar algún efecto bioquímico y/o biológico.
- 3-Un Knock-out funcional de la molécula efectora debe interrumpir, al menos en parte, los efectos mediados por Ras.

Actualmente cuatro proteínas están aceptadas como efectoras de Ras *bona fide*: Raf, PI3K, Ral-GDS y PLC- $\epsilon$ , aunque existe una serie de candidatos que todavía tienen que ser fehacientemente caracterizadas, tales como MKK1, p-120-GAP, NF1, Rin 1 o Tiam.



### 1.1.5.1 Raf Y LA RUTA MEK/ERK.

Raf-1 fue el primer efector de Ras identificado, esta serin/treonin quinasa se une a Ras-GTP tanto *in vivo* como *in vitro* (Moodie et al. 1993; Warne et al. 1993). Esta asociación permite el reclutamiento de Raf a la membrana plasmática donde esta quinasa es activada por un mecanismo aún poco entendido. Raf-1 activado fosforila en residuos de serina a dos proteínas que se unen directamente a su extremo C-terminal (Crews y Erikson 1993), MEK-1, MEK-2 (Map-quinasa-quinasa regulada por señales extracelulares), esta quinasa tiene una especificidad dual y fosforila residuos de serina y treonina de su sustrato, las proteínas quinasas ERK1 y ERK2 (extracelular signal regulated kinasa) (Crews et al 1992), que a su vez son capaces de fosforilar distintos sustratos en distintas localizaciones celulares como la quinasa S60 de la subunidad ribosomal p90, PLAc-2 y PHAS-1. ERK1 y 2 activadas son capaces de formar homodímeros que se translocan al núcleo dando lugar a la activación de distintos factores de transcripción, como Elk1 o Ets-2 a los que fosforila directamente. La importancia de la ruta de ERK queda puesta de manifiesto por el hecho de que el bloqueo de esta ruta usando fármacos inhibidos, o mutantes dominantes negativos de los componentes de esta ruta, tiene efectos dramáticos sobre los procesos biológicos mediados por Ras en la mayor parte de los tipos celulares estudiados (Crespo y León 2000).

### 1.1.5.2 FAMILIA RalGDS Y LA RUTA DE LA GTPasa Ral.

Un factor de intercambio de nucleótidos de las GTPasas RalA y RalB denominado RalGDS (Ral GDP Disociation stimulation), ha sido caracterizado como un efector de Ras por distintos grupos (Kikuchi et al, 1994; Hofer et al, 1994). RalGDS es capaz de unirse al dominio efector de Ras-GTP en respuesta a factores de crecimiento a través de su extremo carboxilo terminal. Esta unión hace que aumente la actividad



intercambiadora de nucleótidos de RalGDS sobre Ral (Urano et al. 1996). La expresión de mutantes dominantes inhibitorios de Ral disminuye la transformación de fibroblastos de ratón NIH3T3 inducida por Ras en más del 60% (White et al 1996). Sin embargo, la activación de Ral inhibe la diferenciación de células PC12 (Goi et al,1999), al contrario de lo que ocurre con otros efectores de Ras, lo que sugiere que Ral juega un papel importante como mediador de la actividad biológica de Ras. Con respecto a los substratos de Ral, se ha visto que es capaz de activar a la fosfolipasa D (PLD), con la participación de la GTPasa Arf (Luo et al1998). Un aspecto muy atractivo de este efector es que constituye una conexión directa con las rutas de señalización mediadas por la familia Rho, ya que Ral-GTP es capaz de unirse a una proteína con actividad GAP llamada RIP-1 que actúa sobre las GTPasas Cdc42 y Rac-1 (Cantor et al 1995;Julien-Flores et al 1996).

#### **1.1.5.3 RUTA DE LA PI3K**

La fosfatidilinositol 3 quinasa es un enzima que cataliza la fosforilación de fosfoinositidos en la posición 3' del anillo de inositol, en respuesta a distintos factores de crecimiento y citoquinas. PI3K esta compuesta por dos subunidades, una reguladora (p85) y una catalítica (p110) de las que a su vez se conocen distintas isoformas (Fruman et al1998; Rodriguez-Viciano et al 1994). Dos de estas subunidades, p110 $\alpha$  y  $\beta$ , han mostrado que son capaces de unirse a Ras-GTP a través de su dominio efector. Existen varias evidencias que permiten afirmar que PI3K está regulada por Ras y que es capaz de mediar varios de los efectos biológicos atribuidos a esta GTPasa (Fruman et al 1998; Rodríguez-Viciano 1996 y1997). Ras tiene un efecto modesto sobre la activación de PI3K, en la mayoría de los casos, sin embargo sinergiza con p85 para inducir la activación de PI3K, lo que indica que la activación total de esta quinasa depende de distintas señales (Hu et al 1995). Hasta la fecha, los substratos principales de PI3K son

Akt/PKB y la quinasa p70 de la subunidad ribosomal S6, implicada en el control de la transcripción. Akt es activada por uno de los productos lipídicos catolizados por PI3K, el PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, que se une directamente su dominio PH, lo que hace que Akt se transloque a la membrana plasmática permitiendo que otras quinasas puedan fosforilarla produciendo su activación (Downward 1998). La activación de Akt genera una potente señal antiapoptótica y regula distintas rutas metabólicas fosforilando a la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), además de otros substratos (Bos 1998; Downward 1998)

#### 1.1.5.4 FOSFOLIPASA C $\epsilon$

El último efector de Ras que ha sido caracterizado fehacientemente es la fosfolipasa C $\epsilon$  (Kelley et al. 2001), que es una isoforma de un enzima crítico en la señalización, que hidroliza fosfolípidos de membrana para generar inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), estimulando incrementos de calcio intracelular y de diacilglicerol (DAG), que a su vez activan isoformas específicas de la proteína quinasa C (PKC). PLC $\epsilon$  se clonó como un homólogo de rata del PLC210 de *Caenorhabditis elegans* que contiene un dominio N-terminal CDC25 like. Se ha comprobado que esta PLC presenta dos dominios de unión a Ras (RA1 YRA2) en su región carboxilo terminal. El dominio RA2 se une a H-Ras de forma dependiente de GTP. Sin embargo, el dominio RA1 es capaz de unirse a Ras GDP con baja afinidad. A pesar de esto, se ha comprobado mediante la realización de ensayos de pull-down (Kelley et al 2001), que H-Ras-GDP no se une a la proteína de fusión GST-PLC $\epsilon$ , mientras que el mutante constitutivamente unido a GTP H-Ras Q61L sí lo hace, lo que demuestra que PLC $\epsilon$  sólo se une a la forma activada de Ras. La delección de los dominios RA1 y RA2 impide la unión de PLC $\epsilon$  a Ras GTP, por lo que estos dominios son fundamentales para la interacción de esta proteína con Ras. Se ha visto que EGF podría estar implicado en la activación de PLC $\epsilon$  ya que es capaz de inducir su sobreexpresión



en células COS-7. La existencia de un dominio CDC25 funcional haría que este enzima tuviera una función dual que podría estar autorregulándose controlando la activación de Ras, o bien sería Ras la que estaría regulando la actividad GEF de forma similar a lo que ocurre con RalGDS.

#### **1.1.6 DIFERENCIAS FUNCIONALES ENTRE H-, K- Y N-Ras.**

Las proteínas Ras en mamíferos son prácticamente idénticas entre sí salvo en los 20 aminoácidos de su extremo carboxilo, por lo que hasta hace pocos años se creía que eran proteínas redundantes. Esta idea era reforzada por el hecho de que todas comparten los mismos efectores y factores de intercambio de nucleótidos. Sin embargo en los últimos años distintos estudios han mostrado que las tres isoformas de Ras presentan, al menos en parte, diferencias funcionales. Así se ha comprobado que las tres isoformas están activadas diferencialmente en distintos tipos de tumores humanos, lo que sugiere cierta especificidad de tejidos (Bos 1989; Rodenhuis 1992). Así K-Ras está activado fundamentalmente en los cánceres de colon y páncreas, H- Ras en los de riñón y piel y N-Ras en mielomas y linfomas (Bos 1989; Rodenhuis 1992). También se ha demostrado que los tres oncogenes tienen distinto potencial transformante en función del tipo celular, como ocurre en fibroblastos rat-2 y NIH-3T3 donde H-Ras es unas diez veces mas transformante que K- y N-Ras (Maher et al 1995). También se ha demostrado que *in vivo* Ras-GRF1 sólo es activo sobre H-Ras (Jones y Jackson 1998), mientras que SmgGDS sólo cataliza el intercambio de nucleótidos de K-ras (Mizuno et al. 1991). Algo parecido ocurre con NF1-GAP, que tiene una afinidad por H-Ras cuatro veces mayor que por N-Ras (Bollag y McCormick 1991). Pero la mayor evidencia de que existen diferencias entre las distintas isoformas proviene de los estudios de los ratones knock-out ya que los ratones mutantes de H-Ras y N-Ras tienen un desarrollo normal, mientras que los ratones K-Ras *-/-* mueren durante el desarrollo embrionario (Umanoff 1995, Koera 1997, Johnson



1997), lo que implica que K-Ras tiene una función exclusiva y necesaria en el desarrollo embrionario que no poseen H-Ras ni N-Ras. La explicación de estas diferencias es uno de los temas que más interés está despertando en los últimos años.

## **1.2 MEMBRANA PLASMÁTICA.**

La membrana plasmática rodea a la célula, definiendo y manteniendo las diferencias en el contenido de la célula y su entorno. Básicamente todas las membranas biológicas tienen la misma estructura de bicapa lipídica y proteica que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Además de servir de barrera, la membrana plasmática, conecta a la célula con el medio exterior, por lo que tienen un papel especial en el transporte transmembranoso de moléculas pequeñas, adquisición de nutrientes, adhesión celular y transducción de señales.

### **1.2.1. COMPONENTES LIPÍDICOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.**

Aunque la membrana plasmática está formada por proteínas y lípidos en distintas proporciones en función de la célula, son los lípidos los que confieren a la membrana su estructura básica. Esta estructura viene determinada por las propiedades físico químicas de los distintos lípidos que la conforman, todos ellos son moléculas anfipáticas presentando una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica. Los tres tipos de lípidos fundamentales de lípidos de membrana son:

**-Fosfolípidos:** presentan una cabeza polar, formada por la unión de distintas moléculas hidrosolubles a glicerol por un enlace fosfodiéster, y dos colas hidrocarbonadas hidrofóbicas de ácido graso, unidas al glicerol a través de un enlace éster. La cabeza polar suele estar formada por la unión de etanolamina, serina, colina o esfingosina, mientras que las colas suelen tener una longitud de 14 a 24 átomos de carbono.

Normalmente una de las cadenas de ácido graso es saturada y la otra presenta una insaturación en *cis* que hace que presente un ángulo en la cadena.

**-Colesterol:** presenta una cabeza polar formada por un grupo OH que forma parte del ciclopentano perhidro fenantreno, cuatro anillos planos esteroideos, y un grupo hidrocarbonado no polar de cola.

**-Glucolípidos:** forman parte de la capa no citoplásmica de la membrana plasmática. Al igual que los fosfolípidos deriva del glicerol pero además de la cadenas policarbonadas de ácido graso, tiene unido distintos azúcares que les confieren distintas propiedades.

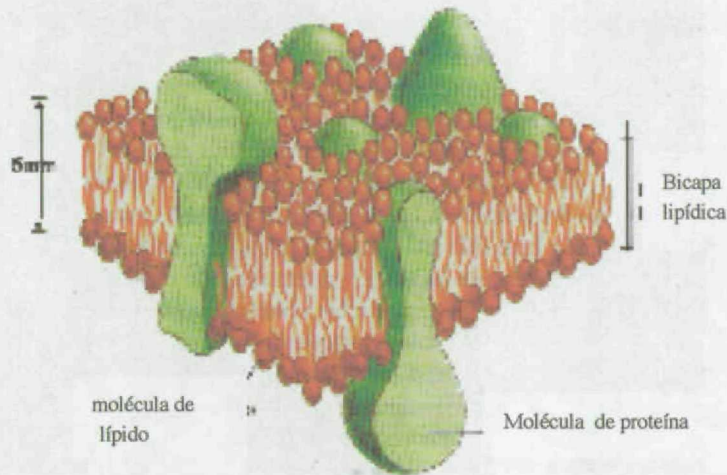
La proporción de los distintos lípidos varía entre distintas membranas, además las dos capas presentan una estructura asimétrica y distinta composición.

### **1.2.2 ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.**

La bicapa lipídica es un fluido bidimensional en el que las cabezas polares de los fosfolípidos quedan situadas hacia el exterior acuoso mientras que las colas hidrofóbicas se sitúan enfrentadas en el interior de la misma. Las moléculas de colesterol aparecen en la membrana con sus grupos hidroxilos próximos a las cabezas polares de los fosfolípidos, mientras que los anillos esteroideos, planos y rígidos, interactúan -y en parte inmovilizan- con las cadenas hidrocarbonadas más cercanas a las cabezas polares, dejando el resto de las cadenas más flexibles. Al disminuir la movilidad de los primeros grupos CH<sub>2</sub> de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, el colesterol aumenta la rigidez de la membrana disminuyendo la permeabilidad de la misma, e impide que las cadenas hidrocarbonadas se unan y cristalicen impidiendo que se dé un fenómeno de transición de fase. Los fosfolípidos pueden difundir lateralmente, rotar sobre sí mismos y flexionarse en una monocapa, pero rara vez pasan de una monocapa a la otra de forma natural (movimiento de flip-flop). Las membranas se forman en la capa exoplásmica de



RE y para que los fosfolípidos pasen de una capa a otra es necesaria la intervención de enzimas llamadas translocadoras de fosfolípidos.



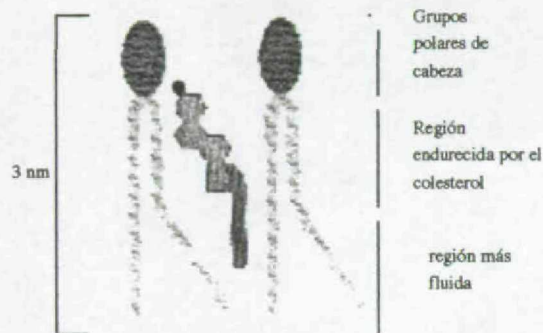
**Figura 6.** Estructura tridimensional de la membrana celular.

Hasta hace unos años el modelo vigente para explicar como se organiza la membrana, establecido por Singer y Nicholson en 1972, denominado modelo del mosaico fluido, proponía que la bicapa lipídica funcionaba como un solvente bidimensional neutro, que no tenía ninguna influencia sobre la función de las proteínas asociadas a membrana. Según este modelo la bicapa sería una balsa lipídica con una composición y estructura uniforme. Pero en los últimos años la mejora de las técnicas ha permitido observar que las bicapas lipídicas presentan distintas fases en las que los lípidos pueden estar en forma de gel, de líquido ordenado, y de líquido desordenado en función del aumento de la fluidez (Brown et al 1998). En la fase de gel los lípidos están semicongelados, mientras que la fase de líquido desordenado se corresponde con el modelo de Singer-Nicholson y es un fluido. El estado de líquido ordenado es intermedio y en él los fosfolípidos con cadenas saturadas se empaquetan estrechamente con las moléculas de colesterol pero mantienen la capacidad de difundir lateralmente. Hasta hace poco no ha sido posible demostrar que en un sistema tan complicado como la membrana plasmática los lípidos aparecen organizados en estas diferentes fases, pero estudios de la polaridad de las células epiteliales ha permitido postular que, al menos en la capa



exoplásmica, existen regiones diferenciadas, formadas por la unión de colesterol a esfingolípidos. La preponderancia de cadenas hidrocarbonadas saturadas en los esfingolípidos permite que el colesterol esté estrechamente unido a estas, de forma similar a lo que ocurre en la fase de líquido ordenado (Simons 1988, 1997). A estas estructuras organizadas de lípidos se las ha denominado *lipid rafts*, y aunque sigue siendo objeto de controversia, la existencia de estos microdominios de membrana ha ganado peso en los últimos años.

**Figura 6.** El colesterol en una membrana lipídica.

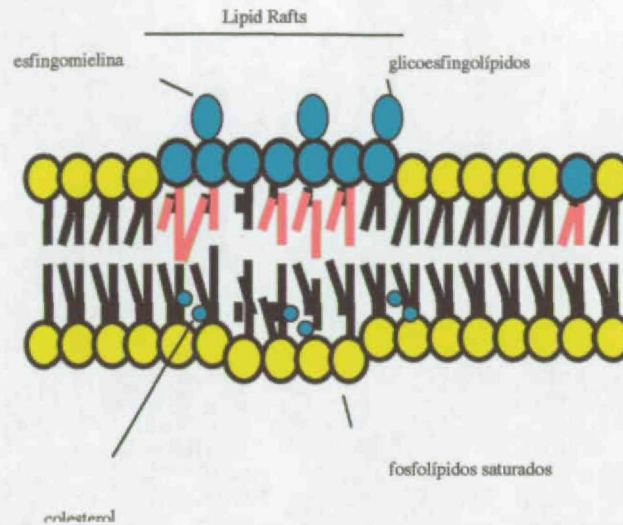


### **Lipid rafts:**

Los *lipid rafts* estarían formados por las dos bicapas, y estabilizados por la interdigitación de las cadenas saturadas de los lípidos de ambas capas, además existirían proteínas transmembrana implicadas en la estructuración y mantenimiento de estos microdominios. El entorno de los *lipid rafts* estaría formado por fosfolípidos con cadenas insaturadas en fase de líquido desordenado, que formarían microdominios de membrana desordenada (Schroeder 1994). Los *lipid rafts*, se caracterizan por la presencia en su capa externa de proteínas ancladas por GPI (glucosilfosfatidilinositol), y por ser insolubles en detergentes lo que permite aislarlas en detergentes no iónicos fríos (Hooper 1999). También se ha visto que a estos microdominios se asocian proteínas doblemente acetiladas como las quinasas de la familia Src o la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas, y proteínas unidas a colesterol como Hedgehog (Rietveld 1999). Una variedad de los *lipid rafts* son las caveolas, pequeñas invaginaciones de la membrana

resistentes a los detergentes, que se caracterizan por la presencia de caveolina, una proteína con forma de horquilla unida estrechamente a colesterol.

**Figura 6.** Estructura de los Lipid Rafts



La fracción total de membrana plasmática que estaría en forma de lipid rafts es una cuestión importante, ya que si solo una pequeña fracción de la membrana tuviera esta estructura, el reclutamiento de proteínas a lipid rafts jugaría un papel importante en procesos biológicos como la transducción de señales al estar aumentando la concentración local de proteínas implicadas en estos procesos. La distribución de los lipid rafts parece variar en función del tipo celular. Por ejemplo, calculando la fracción de membrana que ocupan utilizando el ratio de los lípidos más abundantes en estos dominios, los esfingolípidos, frente a los más abundantes en membrana desordenada, la fosfatidilcolina, se ha calculado que en fibroblastos un 45% de la membrana tendría estructura de lipid rafts (Renkonen 1971), frente al 30% que existiría en linfocitos (Levis 1976). Utilizando anticuerpos que reconocen elementos de los lipid rafts, se ha podido ver que, en fibroblastos las proteínas de estos dominios forman agrupaciones de unos 50nm de diámetro que corresponde a unas 3500 moléculas de esfingolípidos. Debido a su pequeño tamaño, los lipid rafts solo podrían contener un número pequeño de proteínas



por lo que estarían actuando como zonas de concentración de proteínas, rodeadas de amplias zonas de membrana desordenada.

Los lipid rafts son abundantes en la membrana plasmática pero su presencia ha sido observada también en la ruta biosintética y en la endocítica. Mientras que el colesterol se sintetiza en RE, los esfingolípidos acaban de formarse en el aparato de Golgi (van Meer 1989) lo que permite predecir que el ensamblaje de los lipid rafts se producirá en este orgánulo. El transporte de los lipid rafts parece ir dirigido principalmente hacia la membrana plasmática ya que las vesículas que van al RE tienen bajo contenido en esfingolípidos y colesterol (Brugger et al ). El transporte de lipid rafts no acaba en la membrana plasmática, ya que estos dominios son continuamente endocitados pudiendo regresar directamente a la superficie celular desde los endosomas tempranos, o ir al Golgi desde donde pueden ser reenviados de nuevo la membrana plasmática (Puri et al 1999).

### **1.3COMPARTIMENTALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS Ras.**

Como ya se ha dicho, las proteínas Ras acceden a membrana por distintas rutas, H- y N- parecen seguir la ruta exocítica clásica y K-Ras por un mecanismo desconocido (Choy et al 199; Apolloni et al 2000). Además K-Ras presenta una señal de unión a membrana distinta de las otras isoformas. Esto ha hecho pensar que una posible explicación para las diferencias funcionales que presentan las distintas isoformas Ras, sería que estas proteínas estarían localizadas en distintos microdominios de la membrana plasmática.(Prior y Hancock 2001). Además trabajos recientes apuntan a que, al menos en el caso de H-Ras, existe señalización desde endomembranas (Chiu et al 2001).



### **1.3.1 LOCALIZACIÓN DE Ras EN MICRODOMINIOS DE MEMBRANA.**

Se ha establecido que las proteínas de membrana que localizan en lipid rafts se anclan a través de largas moléculas de grupos acilos saturados, mientras que las proteínas que se anclan sólo mediante un grupo farnesilo o geranilo estarían situadas en dominios de membrana desordenada (Melkonian et al 1999; Moffet et al 2000). Esto implica que H-Ras y N-Ras podrían estar localizados en microdominios tipo lipid Rafts, ya que presentan uno o dos grupos palmitilos respectivamente, mientras que K-Ras estaría localizado exclusivamente en dominios de membrana desordenada al estar únicamente farnesilada. La primera evidencia de que las tres isoformas de Ras podían estar localizado en distintos subdominios de membrana se obtuvo al deplecionar la membrana de colesterol químicamente, ya que se ha comprobó que por este mecanismo se impide la activación de Raf por H-Ras pero no por K-Ras (Roy et al 1999). La expresión de un mutante dominante negativo de la caveolina, caveolin DVG, que reduce la concentración de colesterol en la membrana al impedir el transporte intracelular de colesterol (Pol et al 2001), bloquea la función de H-Ras pero no la de K-Ras (Roy et al 1999). Al estudiar la distribución de H-Ras y K-Ras en la membrana utilizando microscopía electrónica (Prior et al 2001), se observa que una proteína GFP unida a la HVR de K-Ras, o a la proteína K-Ras completa no aparece nunca asociada a caveolas, ni a lipid rafts, al contrario que la GFP unida a la HVR de H-Ras. Sorprendentemente, cuando se realiza el estudio con la fusión H-Ras GFP se observa que la localización varía en función de su estado de activación, ya que la forma unida a GDP aparece repartida por igual entre membrana desordenada y lipid rafts, pero en la forma activa, unida a GTP, H-Ras está localizada principalmente en membrana desordenada. Estos resultados sugieren que K-Ras aparece localizado en la membrana desordenada exclusivamente, mientras que H-Ras está presente en ambos microdominios, pero su activación ocurriría principalmente en

dominios lipid Rafts a partir de los que difundiría lateralmente, una vez unido a GTP, a dominios de membrana desordenada donde podría activar a alguna de sus moléculas efectoras que no pueden localizarse en lipid rafts. En el caso de N-Ras poco se sabe de su localización en membrana pero debido a que está también palmitilado es posible que pueda estar en lipid rafts.

### **1.3.2 LOCALIZACIÓN DE Ras EN ENDOMEMBRANAS.**

Diversos trabajos demuestran que H-Ras está también presente en sistemas de endomembranas, como el RE y el aparato de Golgi (Chiu et al 2002; Roy et al 2002). La presencia de H-Ras en esas localizaciones intracelulares no parece ser un fenómeno transitorio, asociado al transporte de y/o reciclaje de esta isoforma desde y hacia la membrana plasmática, si no que parece existir un reservorio permanente de la GTPasa (Chiu et al 2002). Es más, nuevos hallazgos sugieren que la fracción de H-Ras en endomembranas es activa y puede inducir la activación de rutas efectoras como la vía Raf/ERK (Chiu et al 2002; Roy et al 2002).

También se ha observado la presencia de N-Ras en preparaciones de mitocondrias purificadas (Wolfman 2001) que podrían estar relacionadas con la señal antiapoptótica que desencadena esta isoforma en células en estado basal (Wolfman et al. 2000 y 2002).

En el caso de K-Ras hay distintos trabajos que apuntan a una colocalización de esta isoforma con microtúbulos (Thissen et al.1997; Chen et al. 2000 ), lo que estaría de acuerdo con la idea de que K-Ras es la isoforma de Ras preponderante en la regulación de la migración celular.

Estos datos apuntan a que las tres isoformas de Ras presentan distintas localizaciones subcelulares específicas, lo que podría estar determinando sus funciones específicas y la preferencia por los distintos efectores de cada isoforma. Además, teniendo en cuenta que el sistemas de endomembranas es el sistema membranoso más



abundante de las células eucariotas, donde a su vez es posible que las distintas isoformas estén localizadas en microdominios de membrana de distinta naturaleza, por lo que cabe esperar que exista una enorme diversidad de señales que se estarían generando a partir de un pequeño número de moléculas activadas en una única localización



## **2. OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

Las proteínas H-, K y N-Ras son proteínas G pequeñas, que regulan distintas rutas de señalización. Estas GTPasas funcionan como interruptores moleculares, que conectan la señal de distintos receptores de membrana los activados por distintas señales extracelulares, con el interior de la célula. Los miembros de esta familia de proteínas están altamente conservados a lo largo de la evolución. A pesar de que tienen un comportamiento bioquímico y biológico muy parecido, en los últimos años se han acumulado un gran número de evidencias que sugieren que la proteínas Ras presentan diferencias funcionales.

Se han utilizado distintas estrategias para estudiar las diferencias funcionales de las Tres proteínas Ras. Una de las más utilizadas consiste en el uso de los mutantes dominantes inhibitorios H-, K- y N-Ras N17. A pesar de lo común de su uso, hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio comparativo de las especificidades de los mutantes Ras N-17. El objetivo de este estudio ha sido intentar establecer si existían diferencias en el potencial inhibitorio de los mutantes H-, K y N-Ras N17.

Los objetivos concretos de este trabajo han sido:

- 1. Realizar un estudio comparativo de las especificidades inhibitorias de los mutantes H-, K y N-Ras N17.**
- 2. Estudiar el posible papel de la sublocalización de Ras en dominios de membrana en la especificidad de los tres mutantes dominantes inhibitorios Ras N17.**



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **MATERIALES**

##### **3.1 PRODUCTOS**

###### **3.1.1 Reactivos químicos.**

Todos los reactivos químicos y material de uso común en el laboratorio fueron suministrados por Boehringer Mannheim, Falcon, Farmitalia Carbo Erba, Fluca, Gibco, Merck, Pharmacia Biotech, Promega, Millipore y Sigma.

###### **3.1.2. Productos de Biología Molecular**

Los enzimas de restricción y modificación fueron adquiridos a Promega, New England, Stratagene, Bio-Rad, Quiagen, Scheicher & Schuebel, Pharmacia, Wallac y Bhoehringer Mannheim.

###### **3.1.3. Material radiactivo.**

El compuesto radiactivos [ $\gamma^{32}$ -P] ATP fue suministrados por Amersham Pharmacia.

##### **3.2. CULTIVOS CELULARES**

###### **3.2.1. Material de cultivos celulares**

- |   |       |
|---|-------|
| • DMEM                                      | Gibco |
| • Tripsina 1X                               | Gibco |
| • Suero fetal de ternera                    | Gibco |
| • Antibióticos (penicilina, estreptomicina) | Gibco |
| • $\beta$ -mercaptoetnol                    | Sigma |

###### **3.2.2. Factores de crecimiento**

- |       |           |
|-------|-----------|
| • EGF | Peptotech |
|-------|-----------|



- Ácido lisofosfatídico o LPA Sigma
- PDGF Upstate

### 3.2.4. Líneas celulares

Las líneas utilizadas en esta Tesis Doctoral han sido:

**COS-7.** Son células epiteliales de riñón de mono (gluzman, 1981)

**NIH 3T3.** Son células que provienen de cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de ratón (Jainchill y cols., 1969).

**MDCK.** Son células derivadas de riñón de perro adulto, y son de tipo epitelial. (Madin y cols., 1958).

**MEF.** Fibroblasto embrionarios procedentes de ratones Knock-out de N-Ras y de hermanos de camada normales, fueron suministrados por Angel Pellicer. (Umanoff 1995)

## 3.3 ANTICUERPOS

### 3.3.1 Anticuerpos primarios

- Anti-HA (monoclonal) MMS-101, BABCO
- Anti-AU5 (monoclonal) MMS-135, BABCO
- Anti-Flag (monoclonal) Eastman Kodak
- Anti-caveolina 1 (Monoclonal) Transductions laboratories
- Anti-Pan Ras (monoclonal) Calbiochem
- Anti-H-Ras (Monoclonal) sc-29, Santa Cruz Biotechnologies
- Anti-K-Ras (policlonal) sc-521, Santa Cruz Biotechnologies
- Anti-N-Ras (policlonal) sc-519, Santa Cruz Biotechnologies
- Anti-GST (policlonal) sc-138, Santa Cruz Biotechnologies
- Anti-GFP (monoclonal) clones 7.1 y 13.1 Roche Molecular Biochemicals

### 3.3.2 Anticuerpos secundarios.

- anticuerpo frente a ratón conjugado a peroxidasa ICN-Cappel
- anticuerpo frente a conejo conjugado a peroxidasa ICN-Cappel
- anticuerpo frente a cabra conjugado a peroxidasa ICN-Cappel
- anticuerpo frente a ratón conjugado a partículas de oro de 10 nm BioCell

### 3.4 CEPAS BACTERIANAS

Para el mantenimiento, crecimiento y purificación de ADN plasmídico se utilizó la cepa bacteriana DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*.

Para la extracción de proteínas de fusión bacterianas se la cepa BL21 de *E. Coli*.

### 3.5 PLÁSMIDOS

Los plásmidos generados durante esta tesis se indican en letra cursiva; el resto de construcciones utilizadas para este trabajo pertenecen al banco del doctor Piero Crespo, al cual han sido cedidos por los investigadores que se indican.

#### 3.5.1. Vectores

**pCDNA1, pCDNA3, pKH3, pEGFPC1, pCDNA3 GFP, y pCEFL.** Se utilizaron todos estos vectores de expresión en eucariotas, controlados por el promotor de citomegalovirus (CMV), salvo en el caso de pCEFL que está controlado por el promotor de EF1 $\alpha$ .

**pGEX 4T3, pCEFLAU5, pCEFLHA, pCEFLAG, pCDNAHA, pCEFLMyr y pCXN2FLAG.** Se utilizaron estos vectores para la realización de los subclonajes con el fin de obtener proteínas de fusión (vector pGEX) o proteínas etiquetadas con los epítomos adecuados en cada experimento.



### **3.5.2. Vectores de expresión en células de mamíferos:**

#### **-Vectores que expresan proteínas Ras:**

***pCEFL H-Ras wt.*** Expresa la forma salvaje de H-Ras, fue subclonado desde pGEX HA H-Ras wt cortando con Bgl II/Not I y ligado en pCEFL digerido BamHI/NotI.

***pCEFL K-Ras wt.*** Expresa la forma salvaje de K-Ras, el inserto fue subclonado en pCEFL digerido BamHI/Not y se había obtenido desde pGEX K-Ras wt digerido con los mismos enzimas.

***pCEFL N-Ras wt.*** Vector de expresión de la isoforma N-Ras wt, se subclonó desde pGEX N-Ras wt, del mismo modo que K-Ras.

***pCEFL AU5 H-Ras wt.*** Expresa la forma salvaje de H-Ras con el epítipo AU5. Cedido por Silvio Gutkind.

***pCEFL AU5 K-Ras wt.*** Vector de expresión de la forma salvaje de K-Ras con el epítipo AU5. Clonado a partir de pGEX K-Ras.

***pCEFL AU5 N-Ras wt.*** Expresa la proteína salvaje de N-Ras unido en su amino terminal al epítipo AU5. Se clono en este vector digiriendo BamHI/NotI el pGEX N-Ras wt.

***pCEFL HA H-Ras wt.*** Vector de expresión de la proteína H-Ras unida al epítipo HA. El inserto HA-H-Ras se extrajo con los enzimas BamHI/EcoRI del vector pGEX-HA-H-Ras y se subclonó en el vector pCEFL cortado como el inserto.

***pCEFL HA K-Ras wt y pCEFL HA N-Ras wt.*** Expresan las isoformas salvajes de estas proteínas y se subclonaron como sus clones marcados con AU5.

***PCEFLAG H-Ras wt, pCEFLAG K-Ras wt y pCEFLAG N-Ras wt.*** Expresan las tres proteínas salvajes de Ras etiquetadas con el epítipo Flag. Los clones se obtuvieron como los vectores de expresión de las proteínas Ras epitopados con HA.



***pCEFL H-Ras V12.*** Vector de expresión del mutante constitutivamente activado de H-Ras. El inserto H-Ras V12 se obtuvo digiriendo el vector pGEX H-Ras V12 BamHI/NotI y se subclonó en pCEFL digerido con los mismos enzimas.

***pCEFL K-Ras V12.*** Expresa la proteína K-Ras unida constitutivamente a GTP. Se subclonó a partir de pGEX K-Ras V12 digiriendo BamHI/NotI

***pCEFL N-Ras V12.*** Vector de expresión del mutante constitutivamente activado de N-Ras. Subclonado a partir del pGEX N-Ras V12 digerido BamHI/NotI.

***pCEFL H-Ras N17.*** Vector de expresión del mutante dominante inhibitorio de H-Ras. Se obtuvo a partir de pGEX H-Ras N17 digiriendo con BamHI/EcoRI y se subclonó en pCEFL.

***pCEFL K-Ras N17.*** Expresa el mutante dominante inhibitorio de K-Ras. Se obtuvo a partir de construcción que codifica para este mutante en pGEX digiriendo BamHI/NotI.

***pCEFL N-Ras N17.*** Contiene el gen que codifica para el mutante dominante inhibitorio de N-Ras. Se obtuvo el inserto a partir de pGEX N-Ras N17 digiriendo BamHI/NotI y subclonado en pCEFL digerido con los mismos enzimas.

***pCEFL HA H-Ras N17, pCEFL HA K-Ras N17 y pCEFL HA N-Ras N17.*** Expresan los mutantes constitutivamente activados de las proteínas Ras y se obtuvieron subclonando en el vector pCFEL HA BglII/EcoRI o BglII/NotI los insertos obtenidos a partir de las construcciones en pGEX de estos insertos del mismo modo que las construcciones sin el epítipo.

***pCEFL AU5 H-Ras N17, pCEFL AU5 K-Ras N17 y pCEFL AU5 N-Ras N17.*** Construcciones que expresan los mutantes dominantes inhibitorios de Ras unidos en su extremo terminal al epítipo AU5.

*pCEFLAG H-Ras N17*, *pCEFLAG K-Ras N17* y *pCEFLAG N-Ras N17*. Al igual que las construcciones anteriores son subclones de los mutantes dominantes negativos de Ras y se obtuvieron del mismo modo.

*pCEFL AU5 H-Ras Δ CAAX*. Mutante de H-Ras del extremo C-terminal. Para obtener este mutante se introdujo una mutación por PCR en la cisteína 186, utilizando los siguientes oligos:

**Oligo H-Ras 186 S 5'**

**5' AGCTGCAAAAGTGTGCTGTCC 3'**

**Oligo H-Ras 186 S 5'**

**5' GGACAGCACACTTTTGCAGCT 3'**

Carece de la señal de farnesilación. El producto de PCR se digirió BamHI/EcoRI y se subclonó en pCEFL AU5 digerido BglII/EcoRI

*pCEFL Myr AU5 H-RasΔ CAAX*. Se obtuvo el fragmento de AU5-H-Ras-ΔCAAX digiriendo BamHI/EcoRI y se subclonó en el vector pCEFL Myr que contiene la señal de miristilación de Src digerido con BglII.

*pCEFL Myr AU5 N-Ras C186S*. Se mutó la cisteína C186 de la proteína N-Ras utilizando los siguientes oligos:

**Oligo 5'N-Ras S186**

**5' GGATTGCCAAGTGTGGTGATG 3'**

**Oligo 3'N-Ras S186**

**5' CATCACCACACTTGGCAATCC 3'**

El inserto del mutante se subclonó en pCEFL Myr cortado con BglII/EcoRI digiriendolo con BamHI/EcoRI

**-Vectores que expresan fusiones con la proteína verde fluorescente (GFP)**



**pEGFP C1 AU5 H-Ras wt.** Construcción que codifica para la expresión de una proteína de fusión de H-Ras wt con la proteína verde fluorescente. Se subclonó AU5-H-Ras wt digerido BamHI/NotI en el plásmido pEGFP C1 digerido con los mismos enzimas.

**pEGFP C1 AU5 K-Ras wt.** Este plásmido codifica para una proteína de fusión K-Ras-GFP. AU5-K-Ras se obtuvo digiriendo con BamHI/ApaI y subclonando en el vector pEGFP digerido con BglII/ApaI.

**pEGFP C1 AU5 N-Ras wt.** Construcción que codifica para la proteína de fusión N-Ras-GFP. El inserto N-Ras se obtuvo digiriendo BamHI/NotI y se clonó en el vector pEGFP digerido con los mismos enzimas.

**pEGFP C1 H-Ras CAAX.** Vector de expresión de una proteína de fusión de la GFP con los últimos 26 aminoácidos del extremo C-terminal. Cedido por JM Freije.

**pCDNA GFP K-Ras CAAX.** Vector de expresión de una proteína de fusión GFP con la región hipervariable de K-Ras. Cedido por JM Freije.

**pCDNA GFP N-Ras CAAX.** Construcción que expresa una proteína de fusión del extremo C-terminal de N-Ras con la proteína GFP. Cedido por JM Freije.

**-Vectores que expresan serin-treonin quinasas.**

**pCDNA3 MEKE.** Vector de expresión que codifica un mutante de MEK constitutivamente activado, en el que los residuos reguladores Ser 218 y Ser 222 han sido sustituidos por glutámico (Coso et al. 1995).

**pCDNA1 HA-ERK2.** Expresa la proteína salvaje ERK2 etiquetada con el epítipo de la hemaglutinina (Crespo et al 1994)

**pCEFL AU5 ERK2.** Esta construcción se generó a partir del producto resultante de PCR de pCDNA1 HA ERK2 con los siguientes oligonucleótidos:

**-Oligo Bam 5' ERK2**



5' CCGGATCCACGGCGGCGGCCGCGCCG 3'

**-Oligo SP6**

5' CATTAGGTGACAATATAG 3'

Posteriormente, este producto digerido con BamHI/NotI fue subclonado en pCEFL AU5 digerido BglII/NotI

**pXV myc-ERK2.** Expresa la proteína de ERK2 con el epítipo myc. Cedido por B. Jiménez.

**-Vectores que codifican para factores de intercambio de nucleótidos.**

**pCEFL HA SOS1.** Vector que expresa la proteína SOS1 etiquetada con el epítipo HA. Cedido por E.Santos.

**pCEV 29 Ras-GRF1 wt.** Expresa la proteína Ras-GRF1.

**pKH3 Ras-GRF1 wt.** Expresa la forma salvaje del factor de intercambio etiquetado con tres epítopos seguidos de HA en su extremo N-terminal. Cedido por R. Mattingly.

**pCDNA Flag Ras-GRF2.** Expresa la forma salvaje de GRF-2 unido al epítipo Flag. Cedido por M. Moran.

**pCXN2 Flag Cal-DAG I.** Expresa el factor de intercambio unido a Flag. Cedido por M. Matsuda.

**pCXN2 Flag Cal-DAG II.** Expresa este GEF unido a Flag. Cedido por M. Matsuda.

**pCXN2 Flag Cal-DAG III.** Expresa este Ras-GRP unido a Flag. Cedido por M. Matsuda.

**3.5.3. Vectores que producen proteínas de fusión en bacterias.**

**pGEX 4T-1 RAF RBD.** Fusión entre GST y el dominio de unión a Ras de Raf (aa 1-149). Cedido por S.J Taylor.

**pGEX 2T RAF RBD A85K.** Proteína de fusión de Raf RBD (aa 51-131) con GST.

Cedido por A. Burgess.

**pGEX 4T3 H Ras N17.** Proteína de fusión del mutante dominante inhibitorio de H-Ras.

Cedido por L. Feig.

**pGEX4T3 K Ras N17 y pGEX 4T3 N Ras N17.** Expresan los mutantes dominantes negativos de estas isoformas fusionados a GST. Ambos fueron obtenidos mutando sus respectivas formas salvajes con los mismos oligos:

**Oligo K/N17 5'**

**5' GGCAAGAATGCCTTGACGATA 3'**

**Oligo K/N17 3'**

**5' CAAGGCATTCTTGCCTACGCC 3'**

El producto de la PCR se clonó BamHI/NotI en pGEX 4T3.

## **MÉTODOS**

### **3.6 TÉCNICAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.**

Las técnicas básicas de biología molecular para llevar a cabo los clonajes de esta tesis, tales como la obtención de células bacterianas competentes, transformación bacteriana, aislamiento y purificación de ADN a pequeña escala, electroforesis en geles de agarosa, etc. se han realizado según los métodos expuestos por Sambrook y colaboradores (Sambrook et al., 1989)

### **3.7 EXTRACCIÓN DEL ADN PLASMÍDICO.**

Un cultivo bacteriano en 500ml de LB se creció durante doce horas a 37°C. tras lo que se centrifugó a 10.000 rpm durante diez minutos y el precipitado celular se



resuspendió en 10 ml del **tampón de resuspensión**: 50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA, 10 µg/ml RNasa A. A continuación, las células se lisaron con 10 ml de **tampón de lisis**: 200 mM NaOH y 1% SDS, y se incubaron cinco minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 10 ml de una **solución de neutralización** que contiene 3M de acetato potásico pH 5.5, incubándose cinco minutos en hielo y después se centrifugó la mezcla a 10.000 rpm durante veinte minutos a 4°C. Para la obtención del ADN plasmídico, el sobrenadante se pasó por columnas de intercambio de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Al eluato obtenido se le añadieron 10 ml de isopropanol y se dejó precipitar el ADN durante cinco minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó la mezcla a 10.000 rpm durante treinta minutos y a 4°C de temperatura. Por último, el precipitado de ADN se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 300 µl de T.E. (Tris/EDTA pH 7.4), tras lo que se congeló a -20°C hasta su uso para posteriores transfecciones.

### **3.8. CULTIVOS CELULARES**

Las células COS7, NIH3T3 y MDCK fueron cultivadas en medio DMEM (Gibco BRL) suplementado con un 10% de suero fetal de ternera inactivado (Gibco BRL), y 100µg/ml de una mezcla de penicilina y estreptomicina, a una temperatura de 37°C y en presencia de un 5% de CO<sub>2</sub>, además de un 95% de humedad.

Las células MEF fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con un 10% de suero fetal inactivado, L-glutamina 2mM, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales y 55 µM de β-mercaptoetanol.

### **3.9 TRANSFECCIONES TRANSITORIAS DE CÉLULAS COS-7, NIH-3T3, MDCK Y MEF.**



Las células COS-7 se transfectaron mediante el método del DEAE-DEXTRANO, mientras que las células NIH 3T3, MDCK y MEF se transfectaron por el método de la lipofectamina.

#### **Método de transfección con DEAE-DEXTRANO.**

Se sembraron las células en placas de 60 mm de forma que en cada una hubiera aproximadamente  $3 \times 10^6$ .

Al día siguiente se preparo la mezcla de transfección, consistente en:

- 2,5 ml de medio DMEM si suero
- 10µl de solución 10mg/ml de DEAE-DEXTRANO (Sigma) en PBS
- 2µl de una solución 60 mg/ml en PBS de cloroquina.
- El ADN (las concentraciones dependientes del ensayo entre 100ng y 2µg)

Esta mezcla se añadió a las células previamente lavadas con PBS 1x. La cantidad total de ADN fue igualada en todas las muestras con vector vacío.

Se incubaron las células con la mezcla de transfección dos horas a 37 °C. Pasado este tiempo se retiró la mezcla y se sometió a las células a un choque de dimetilsulfuro (DMSO), incubando las células con 3ml de una dilución al 10% de DMSO en PBS 1x durante dos minutos en el incubador. Se retiró la disolución y se lavaron las células con PBS 1x, después se añadió DMEM 10% Fetal. Al cabo de dos días se recogieron las células que habían sido privadas de suero durante 16h.

#### **Método de transfección con lipofectamina.**

Las células sembradas la noche antes en placas de 60 mm (ensayos de la actividad quinasas, pull-downs, fraccionamientos), o 100mm (microscopía electrónica), se transfectaron con el reactivo **lipofectamina plus** (Gibco BRL) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se usaron las mismas cantidades de ADN y se igualaron con el plásmido vacío. A las cinco horas de añadir la mezcla de transfección se recogió el medio de las placas y se cambió por medio DMEM 10% fetal.

Las células se recogieron en hielo con el tampón de lisis correspondiente a cada experimento.

### **3.10 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS**

#### **3.10.1 Extracción de proteínas celulares y análisis por *western blot* (WB).**

Para la obtención de los extractos totales de proteína proveniente de cultivos celulares, se recogieron las células en hielo y se lisaron con 500 µl de un **tampón de lisis de alta astringencia** constituido por: 20mM HEPES pH 7.5, 10mM EGTA, 40 mM β-glicerofosfato, 1% detergente no iónico NP40, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ortovanadato, 1mM DTT (ditiotriol) y extemporáneamente los inhibidores de proteasas 10µg/ml aprotinina y 10µg/ml leupeptina. Se clarificaron los lisados por centrifugación a 13.000 rpm durante siete minutos. La concentración de proteína en los lisados se determinó por colorimetría según el método de Bradford (Bradford, 1975) empleando albúmina de suero bovino (BSA) para establecer una recta patrón, y se realizó la medición de las concentraciones en un aparato de ELISA. Se tomaron aproximadamente 50µg de proteína, a los que se añadió tampón de carga Laemli 5X. Tras hervir las muestras durante cinco minutos, se sometieron a electroforesis en un gel vertical de poliacrilamida (29:1)-SDS (dodecil sulfato sódico) del 12% para todos los experimentos. La electroforesis vertical se llevó a cabo en un **tampón A**: 25mM Trizma base, 192mM Glicina y 0.1% SDS. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Potran, Schleider & Schuell) durante quince minutos a 400 mA en el caso de las proteínas de la familia Ras, treinta minutos en el caso de ERK2 y una hora para los GEF, en un **tampón B**: 25 mM Trizma base y 192 mM Glicina.

Finalizada la transferencia, los filtros de nitrocelulosa se incubaron dos horas a temperatura ambiente y con agitación en una solución de TBS-T (Tris Buffered Saline-Tween, es decir, 20 mM Tris pH 7.5, 137 mM NaCl y 0.05% de Tween 20) con un 4% de BSA, para bloquear los sitios inespecíficos. Tras ello, los filtros fueron incubados con el anticuerpo primario (0.2-0.4 µg/ml o las concentraciones indicadas por la casa comercial, en cada caso concreto) diluido en BSA al 4% en TBS-T durante una hora, como mínimo. Se realizaron dos lavados con TBS-T durante un total de quince minutos, tras los cuales



se incubaron los filtros con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, a una dilución 1:5000 en BSA al 0.4% en TBS-T durante treinta y cinco minutos a temperatura ambiente. Se realizaron de nuevo dos lavados con TBS-T, y se procedió a la detección de la proteína por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech). Para finalizar, se realizó una autorradiografía de los filtros con películas Konica.

### **3.10.2 Fraccionamiento subcelular.**

Para la obtención de distintas fracciones subcelulares, se lavaron las células tres veces con PBS 1x frío y una vez con Hepes 20 mM pH 7,4 frío. Las células se recogieron en 0,4 ml de un tampón suave (Hepes 20 mM, pH 7,4) y se colocaron en hielo. Se pasaron los lisados 8 veces por una jeringa con una aguja de 9G y 10 veces por una de 19G.

Se eliminaron los núcleos mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos y se separaron los 50µl del lisado total. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman con rotor TL100 a 100000g durante 30 minutos. Se recogió el sobrenadante, fracción citosólica (S100), y el precipitado se resuspendió en el mismo volumen de tampón que la fracción S100, siendo la fracción particulada (P100).

### **3.10.3 Fraccionamiento de proteínas de membrana en gradientes de sacarosa.**

Células COS-7 transfectadas dos días antes en placas de 100mm se recolectaron con PBS 1x y se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm. El precipitado de células se resuspendió en un tampón que contenía Tris 25mM pH 7,4, 150mM de NaCl, 5mM de EDTA y 0,25% de Tritón X-100 más inhibidores añadidos extemporáneamente y se solubilizó durante una hora a 4°C. Posteriormente se añadió sacarosa en polvo hasta una

concentración del 41% y se dejó disolver bien. Se depositó la muestra en un tubo Beckman blando de 12 ml (ref. 344059), y sobre ella se añadieron 8,5 ml de una solución de sacarosa al 35% en Tris 10 mM pH 7,4, y 2,5 ml de solución de sacarosa al 16 %. Los tubos se centrifugaron en un rotor Beckman SW41 a 35.000 rpm durante 18h.

Se recogieron 12 fracciones, que se precipitaron en 6,5% de ácido tricloroacético y 0,05 % de desoxicolato sódico. Tras 20 minutos de incubación a temperatura ambiente se centrifugaron los precipitados a 13.000 rpm y se lavaron con acetona al 80% fría. Los precipitados se resuspendieron en tampón Laemli de carga de proteínas y se resolvieron las proteínas en un gel del 12 % SDS-PAGE, que posteriormente se transfirió a una membrana y se realizó un WB.

### **3.11 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE PROTEÍNAS.**

#### **3.11.1 Ensayos de actividad MAPK**

Para determinar la actividad quinasa de las proteínas de ERK se utilizó el ensayo quinasa puesto a punto por P. Crespo (Crespo et al., 1994b). Se recogieron las células y se lisaron en el con el siguiente tampón: 20mM HEPES pH 7.5, 10mM EGTA, 40 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 1% detergente no iónico NP40, 2.5 mM  $MgCl_2$ , 1mM Ortovanadato sódico, 1mM DTT (ditiotreitól) y extemporáneamente 10 $\mu$ g/ml aprotinina y 10 $\mu$ g/ml leupeptina. Tras esto, los lisados se centrifugaron a 13.000 rpm durante siete minutos y los sobrenadantes se incubaron con 0.2  $\mu$ g de anticuerpo anti-HA o anti-AU5 en función del epítipo de la MAPK transfectada, durante una hora a 4°C. Antes de realizar la inmunoprecipitación se guardaron 40 $\mu$ l de lisado total para luego poder detectar por WB las proteínas estudiadas y comprobar que su actividad en el ensayo quinasa se correlaciona con su expresión en el *western blot*. Se recuperaron los inmunocomplejos con 20  $\mu$ l de proteína G-Sepharosa (Pharmacia), manteniéndose en



agitación durante quince minutos a 4°C. Estos inmunocomplejos se lavaron tres veces con PBS 1% NP40 , una vez con 100mM Tris pH 7.5, 0.5 M LiCl y una vez con el **tampón de reacción de quinasa**: 12.5 mM MOPS pH 7.5, 12.5 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 7.5 mM  $MgCl_2$ , 0.5 mM EGTA, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM NaF, 0.5 mM Ortovanadato sódico y 1mM DTT. El ensayo quinasa se llevó a cabo en 30  $\mu$ l totales de tampón de reacción, conteniendo además: 1  $\mu$ Ci  $^{32}\gamma$ -ATP, 20  $\mu$ M ATP frío (de un stock 1mM, 1.5  $\mu$ l/muestra) y 1.5 mg/ml del sustrato **MBP** ( proteína básica de mielina de Sigma).

Se incubaron las muestras a 30° C durante treinta minutos y se paró la reacción por adición de tampón de carga Laemli 5X. Las muestras se hirvieron y se resolvieron por electroforesis en un gel al 12% de acrilamida (29:1) con 0.1% de agente desnaturizante SDS y utilizando como tampón de electroforesis vertical el mismo que el utilizado para resolver los geles de *western blot*, esto es **Tampón A**: 25 mM Trizma Base, 192 mM Glicina y 0.1% SDS. Se secó el gel en un secageles o GEL-DRYER 583(Bio-Rad) y se realizó una autorradiografía en película fotográfica (Konica). Los geles se cuantificaron en un InstantImager (modelo 662A202401, Packard), o con el programa NIH Image 1.60/fat.

### **3.11.2 Obtención de proteínas recombinantes para los ensayos de unión de proteínas *in vitro*.**

El sistema de fusión génica GST (Glutathione S-transferase) es un método muy útil para la purificación de proteínas producidas en *E.Coli* como fusiones con GST de *Schistosoma japonicum*. Los plásmidos pGEX están diseñados para obtener elevados niveles de expresión inducible de genes o de fragmentos de genes.

Las proteínas recombinantes fusionadas se produjeron en *E.Coli* inoculando 100ml de medio LB toda la noche a 37°C. Al día siguiente el inóculo se diluyó 1/10 en

medio LB y se creció durante tres horas a 37°C. La inducción de proteínas recombinantes se realizó añadiendo una concentración 0.1mM de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido, Sigma), y se dejó a 37°C entre 2 y 4 horas. Las bacterias se recogieron centrifugando a 6.000 rpm durante diez minutos y se resuspendieron en un **tampón I**: PBS 1X, 1% NP40, 10 $\mu$ g/ml aprotinina y 10 $\mu$ g/ml leupeptina y se sonicaron 10 veces durante 20 segundos a la máxima potencia del sonicador (Soniprep 150,MSE). El extracto del sonificado se centrifugó a 3.500 rpm durante veinticinco minutos a 4°C, se añadieron al sobrenadante 350  $\mu$ l de Glutation Sepharose-4B (Amersham Pharmacia) para recuperar la proteína GST, y se incubó dos horas a 4°C en agitación orbital. La matriz de Glutation Sepharose-4B con la proteína de fusión asociada se lavó tres veces con el tampón I frío, dos veces más con PBS frío y una vez con el tampón **MLB**: Hepes 25 mM pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1 % Nonidet-P40, 10% glicerol, 25 mM NaF, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, EDTA 1mM, y ortovanadato sódico 1mM.

### **3.11.3 Ensayo por pull down del intercambio de nucleótidos.**

La medida de la tasa de intercambio de nucleótidos se llevó a cabo utilizando células COS-7 transfectadas con los plásmidos que codifican para las distintas isoformas de Ras etiquetadas con los epítomos HA, AU5 o Flag junto con los que codifican para los mutantes dominantes inhibitorios de Ras con los mismos epítomos, y estimulando con EGF. Tras la transfección las células se incubaron durante 24 horas con medio DMEM 10% fetal, para posteriormente mantenerlas 16 horas privadas de suero. Las células lavadas con PBS 1x se lisaron con el tampón MLB, se centrifugaron 12 minutos a 13.000 rpm y el sobrenadante se incubó durante un mínimo de una hora con la proteína de fusión pGEX Raf RBD o pGEX Raf RBD A85K. Después de la incubación se lavaron los



precipitados de las bolas de glutation, que contenían las proteínas de fusión, con tampón MLB dos veces y se realizó el WB de los precipitados y de los lisados totales. La cantidad de Ras GTP se determinó respecto a Ras que contenían los lisados totales que habíamos apartado previamente utilizando el programa NIH Image 1.60/fat.

### **3.12 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.**

Células MDCK transfectadas con los vectores que codifican GFP H-Ras, GFP-K-Ras y GFP-N-Ras y los que codifican la fusión GFP con la región hipervariable de las tres isoformas, fueron fijadas con paraformaldehído al 3,7% pH7,4 y glutaraldehído 0,1% disueltos en PBS 1X durante 20 minutos. Las células se recogieron, y se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm. Las células precipitadas se lavaron con PBS 1x y se deshidrataron con concentraciones crecientes de metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente incluirlas en Lowcryl K4M, también a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y por último se polimerizaron irradiándolas con luz ultravioleta. Secciones ultrafinas se montaron en rejillas de níquel y se incubaron con 0.1 M de glicina disuelta en PBS durante 15 minutos, después con una solución albúmina bovina al 5% en PBS y por último con el anticuerpo monoclonal de la GFP en una disolución 1:100 en PBS, 1% albúmina bovina y 0,1 M de glicina. Una vez lavadas, las secciones se incubaron con el anticuerpo de cabra unido a oro de 10 nm de diámetro que reconoce las IgG de ratón (diluido 1:50 en albumina al 1% en PBS). Después del marcaje con oro de las muestras, las secciones ultrafinas fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato y examinadas con un microscopio electrónico Philips EM208 que operaba a 60 kV. Como control se utilizaron secciones ultrafinas que se habían tratado como se indica pero sin añadir el anticuerpo primario

## **4. RESULTADOS**



## **4. RESULTADOS**

### **4.1 COMPARACIÓN DEL POTENCIAL INHIBITORIO DE LOS MUTANTES H-, K- y N-Ras N17.**

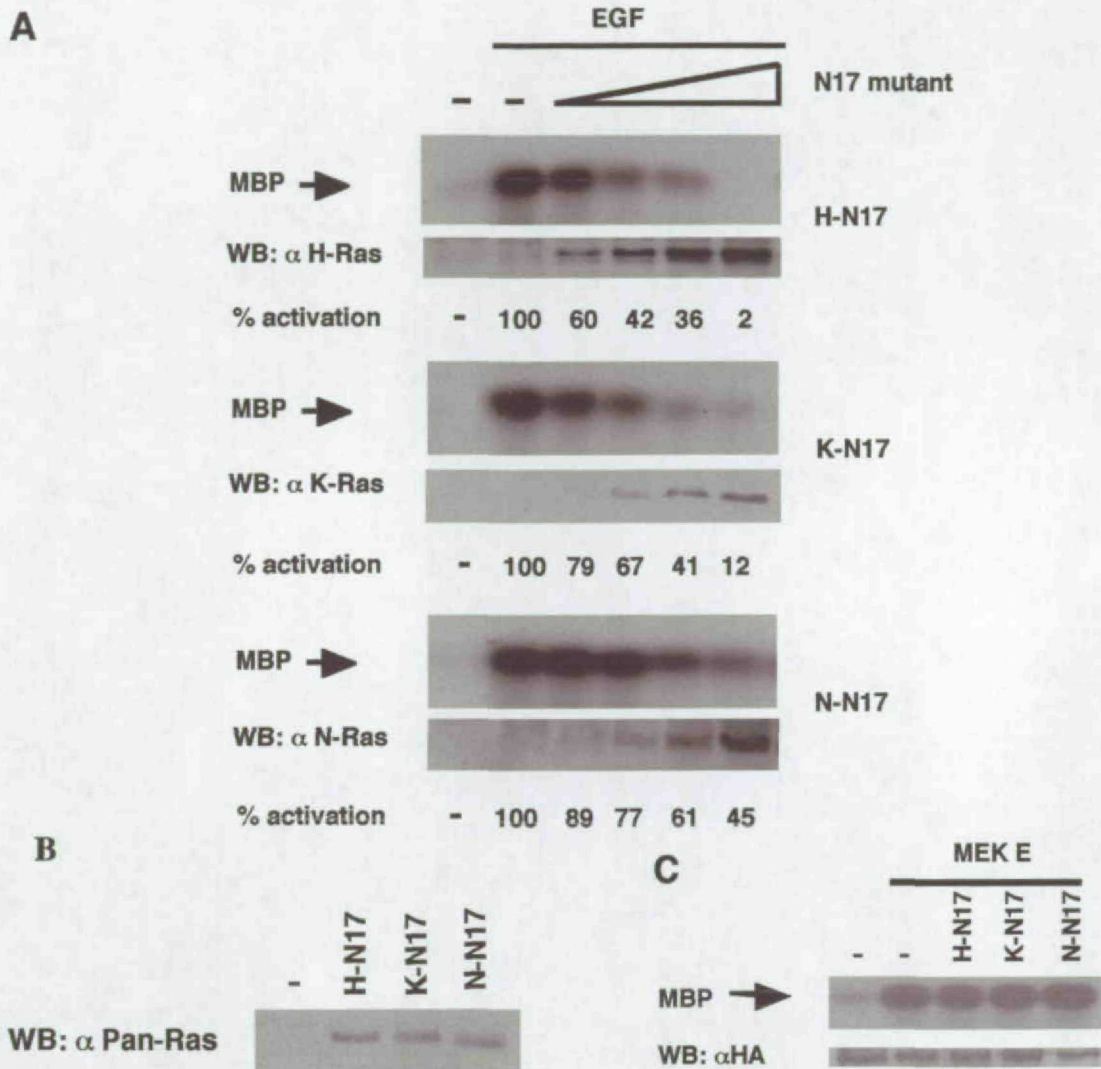
La utilización de mutantes dominantes inhibitorios de Ras ha demostrado ser una de las herramientas más útiles para interferir en la activación de H-, K- y N-Ras y así estudiar los procesos en los que están implicados los miembros de esta familia de proteínas. Su utilización, no obstante, debe realizarse de forma controlada, para evitar la aparición de efectos inespecíficos, por esta razón, la primera parte de esta tesis se centró en determinar las condiciones óptimas a las que debían ser utilizados los mutantes dominantes inhibitorios de Ras.

#### **4.1.1 Inhibición de la activación de ERK2 dependiente de la concentración de los mutantes dominantes inhibitorios**

Como una primera aproximación para investigar la especificidad inhibitoria de los mutantes H-, K(B)- y N-Ras N17, se comparó el potencial inhibitorio de los tres mutantes sobre la activación de ERK2 inducida por EGF en células Cos-7. Un modelo en el que estudios anteriores han demostrado que el mutante dominante inhibitorio H-N17 inhibe potentemente esta activación (Crespo et al. 1994). Para ello, se cotransfectaron células Cos-7 con una construcción de ERK2 etiquetada con el epítipo HA y con concentraciones crecientes de las construcciones que expresan los tres mutantes dominantes inhibitorios. Cuando se estimuló con EGF se comprobó que H-, K- y N-Ras N17 eran capaces de disminuir la activación de ERK2 por EGF, aunque con distinta intensidad. Así, a los niveles máximos de expresión, H-N17 causó una inhibición total de la activación de ERK2, K-N17 la inhibió en un 88%, mientras que N-N17 exhibía la menor capacidad inhibitoria sobre la activación de ERK2 por EGF, de aproximadamente un 55% (Fig.1A).

También monitorizamos los niveles de expresión de las proteínas de los tres mutantes Ras-N17. Para ello se utilizaron anticuerpos que reconocen específicamente las tres isoformas de Ras. Comprobamos que en los tres casos existía una correlación entre el aumento de la concentración de proteínas y su efecto inhibitorio. Como puede haber grandes variaciones en la afinidad de los anticuerpos específicos exhiben hacia sus respectivas isoformas, también se realizó una comparación de los niveles de expresión de las tres proteínas utilizando un anticuerpo pan-Ras que reconoce a las tres isoformas con la misma afinidad, descartando así que las variaciones en la capacidad de inhibición de los tres mutantes, se debieran a diferencias en sus niveles de expresión. Como se muestra en la

figura 1B, cuando se transfectaron 250ng de las respectivas construcciones, los niveles de los tres mutantes N17 eran similares.



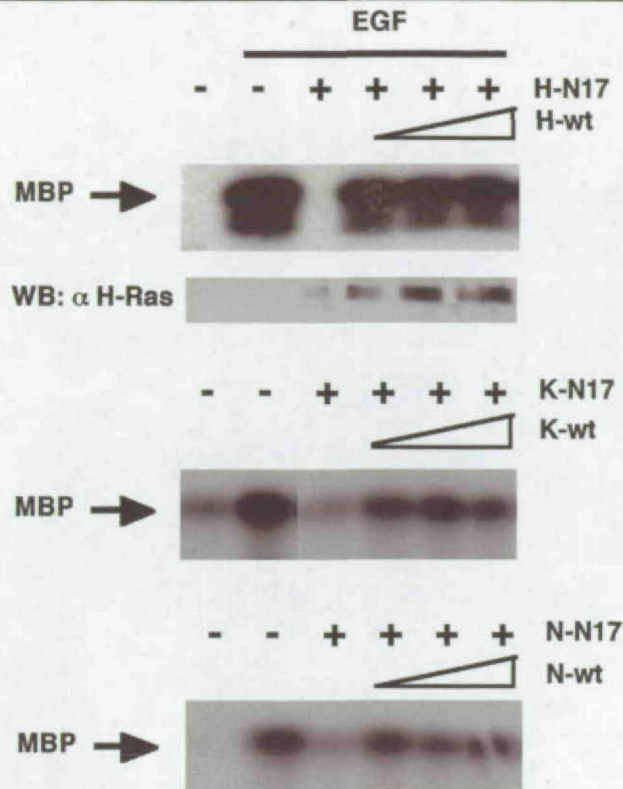
**Figura 1.** A: inhibición de la activación de ERK2 dependiente de la concentración de los mutantes dominantes inhibitorios de Ras. Se realizaron ensayos de la actividad quinasa, usando MBP como sustrato, de inmunoprecipitados de células COS-7 cotransfectadas con ERK2 (1μg) junto con el vector (-) o concentraciones crecientes (50, 100, 200 y 250 ng) de las construcciones que codifican H-N17, K-N17 y N-N17 según se indica en cada caso; las células se estimularon con EGF (100ng/ml) durante 5 min. después de 12 horas de privación de suero. Los paneles inferiores son WB para monitorizar los niveles de H-N17, K-N17 y N-N17, realizados con los anticuerpos específicos de cada isoforma. En los paneles se indica la activación media, en tres experimentos, relativa a la activación de células tratadas con EGF. C: Niveles de expresión de H-N17, K-N17 y N-N17 lisados totales de células transfectadas con 250ng de las construcciones que los codifican, y monitorizados por WB mediante la utilización anti-pan-Ras. D: efecto de la expresión de los mutantes dominantes inhibitorios sobre la activación de ERK2 mediada por MEK1. Los ensayo se realizaron con inmunoprecipitados de lisados de células COS7 cotransfectadas con HA-ERK2 (1μg), y MEK EE (1μg) y los plásmidos de H-N17, K-N17 y N-N17 (250ng), con anti-HA. Paneles inferiores, niveles de proteína de HA-ERK2 monitorizados por WB con el anticuerpo de HA.



Para descartar que la inhibición de la activación de ERK2 estimulada por EGF se debiera a la existencia de efectos inespecíficos, independientes de la transducción de señales mediada por las proteínas de la familia Ras, se cotransfectó junto con los mutantes H-N17, K-N17 y N-N17, un mutante constitutivamente activado de MEK1 (MEKE) que se sabe que produce la activación de ERK2 actúa "down stream" de Ras (Coso et al 1995). Observamos que la activación de ERK2 por MEKE no se veía afectada por la expresión de los mutantes dominantes inhibitorios (Fig. 1C), lo que verificaba que los efectos inhibitorios de H- K- Y N-N17 estaban efectivamente mediados por Ras

#### **4.1.2 La inhibición de ERK2 por los mutantes H-, K- y N-Ras N17 es rescatada por la sobreexpresión de la proteína Ras salvaje.**

Se sabe que el efecto inhibitorio específico del mutante H-Ras N17 puede ser rescatado por una sobreexpresión de la proteína H-Ras salvaje (Feig y Cooper 1988; Stacey et al. 1991). Por esta razón, se decidió estudiar si la inhibición de la activación de ERK2 por EGF debida a K- y N-N17, era también rescatada por la sobreexpresión de sus respectivas proteínas salvajes. Para este menester, se contranfectaron células Cos-7 con H-N17, K-N17 y N- N17, junto con concentraciones crecientes de los plásmidos que codifican para sus respectivas proteínas salvajes, además de la misma concentración de HA-ERK2. Como se ve en la figura 2, las proteínas salvajes eran capaces de rescatar la inhibición de la activación de ERK2 por EGF producida por sus respectivos mutantes inhibitorios, incluso a bajos niveles de expresión. Así se comprobó que con tan solo una relación 2:1 en los niveles de expresión Ras wt/Ras N17, se producía este rescate. Para descartar que el aumento de la expresión de las proteínas Ras salvajes fuera el causante de la activación de ERK-2, se cotransfectaron los plásmidos que codifican para las proteínas H-, K- y N- Ras salvajes junto con HA- ERK2 y se comprobó que incluso con altos niveles de expresión de estas proteínas, la activación de ERK2 producida por las proteínas Ras salvajes, era muy baja y en ningún caso comparable a la de los experimentos de rescate.



**Figura 2. Rescate de la inhibición debida a H-, K- y N-N17 por sus respectivas proteínas salvajes.** Se cotransfectaron células COS-7 con AU5-ERK2 (1µg), con el vector (-) o con 250ng de los plásmidos H-N17, K-N17 y N-N17 (+) donde se indica, junto con concentraciones crecientes (500ng, 750ng y 1µg) de plásmidos que codifican H-, K- y N-Ras salvajes (wt). Se estimularon las células deprivadas de suero durante 12 con EGF (100 ng/ml) durante 5 min. y se realizaron ensayos de la actividad quinasa inmunoprecipitando con anti-AU5, utilizando MBP como sustrato. Paneles inferiores: niveles de la proteína H-Ras determinados por WB usando anticuerpo específico para H-Ras.

## 4.2 ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD INHIBITORIA DE LOS MUTANTES H-, K- Y N-Ras N17

### 4.2.1. Rescate de la inhibición de los mutantes dominantes inhibitorios por isoformas de Ras heterólogas.

Decidimos estudiar si el efecto inhibitorio de un mutante N17 de Ras podía ser rescatada solamente por su homólogo salvaje o alternativamente por cualquiera de las proteínas Ras salvajes. Para este objetivo, se cotransfectaron células Cos-7 con AU5-ERK2 con plásmidos que codifican H-N17, K-N17 y N-N17 etiquetadas con el epítipo HA, más los plásmidos que expresan H-, K- y N- Ras salvaje etiquetados con el epítipo FLAG. Las células fueron estimuladas con EGF y se lisaron, tras lo cual, se realizaron ensayos para determinar el grado de activación de ERK2. De forma empírica, se observó que las proteínas Ras salvajes tenían que expresarse por encima de una determinada concentración para que



podieran ejercer un rescate del efecto inhibitorio de los mutantes Ras, ya que pequeñas variaciones en los niveles de expresión de las proteínas Ras salvajes o de los mutantes N17, podían determinar que hubiera una activación o una inhibición de ERK2. Para poder controlar los niveles de expresión relativa de las proteínas Ras en esta serie de experimentos, se calculó el ratio de la señal de las proteínas HA-Ras N17 con respecto a las proteínas FLAG Ras wt. Este ratio no era una comparación exacta de los niveles de expresión de las proteínas salvajes, ya que se utilizaron dos anticuerpos distintos, anti-HA y Anti-FLAG, que presentaban distinta afinidad por sus respectivos epítopos. A pesar de ello, el cálculo del ratio de la señal de HA entre la de FLAG resultó altamente informativo, ya que se pudo comprobar que se mantenía constante en nuestras condiciones experimentales.

Los resultados de estos experimentos mostraron claramente que los mutantes Ras N17 presentan diferencias en sus especificidades inhibitorias. En el caso de H-N17, se observó que el bloqueo que acusaba de la activación de ERK2 inducido por EGF, únicamente era rescatado totalmente por H-Ras wt, mientras que K-Ras wt y N-Ras wt sólo producían un leve rescate de este efecto (12% y 16% respectivamente) (Fig. 3A). Estas diferencias en la capacidad de rescatar la inhibición de Ras, no eran debidas a diferencias en los niveles de expresión de las proteínas, ya que el ratio HA/FLAG era prácticamente idéntico en todos los casos. Con respecto a K-N17, el efecto inhibitorio sobre la activación de ERK2 era completamente rescatado por H-Ras wt, y en gran medida por K-Ras wt (alrededor del 79%), mientras que la expresión de N-Ras wt no producía ningún efecto (Fig. 3B). De forma similar, la inhibición de ERK2 debida a N-N17 era rescatada totalmente por N-Ras wt, mientras que H-Ras wt la rescataba en un 78%, pero no se veía afectada en absoluto por K-Ras wt (Fig. 3C). Estos resultados constituían la primera evidencia de que existen diferencias en las propiedades inhibitorias de los mutantes H-, K- y N-Ras N17.

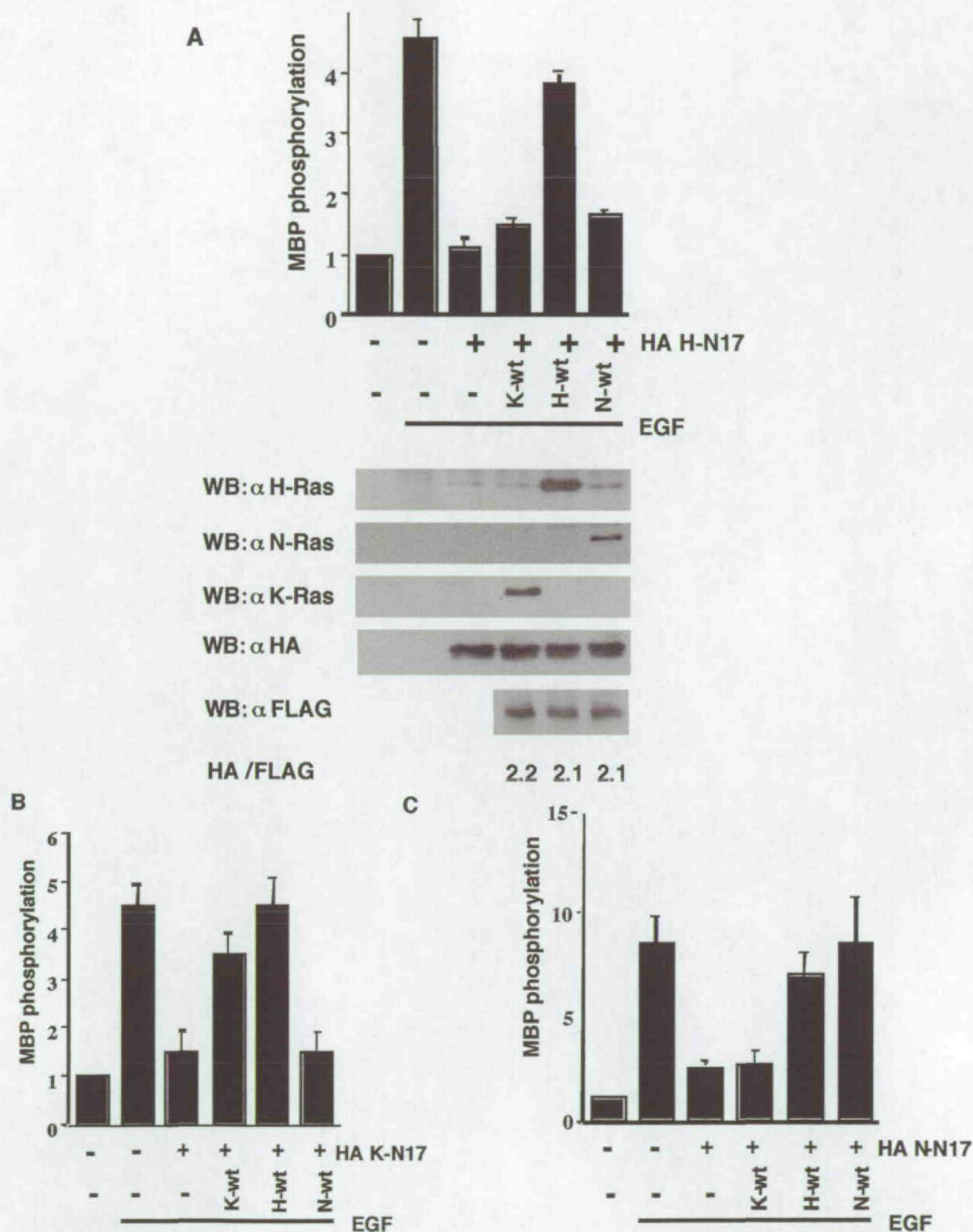


Figura 3. Rescate de la inhibición de las isoformas de Ras debida a los mutantes H-, K- y N-N17. A: Rescate de la inhibición de la activación de ERK2, debida a H-N17, por H-, K- y N-Ras



wt. Se cotransfectaron células COS-7 con AU5-ERK2 (1µg), con vector vacío (-), y con 250 ng de HA-N17 (+), junto con 500ng de los plásmidos que codifican H-, K- y N-Ras etiquetadas con el epítopo FLAG. Los ensayos de la actividad quinasa se realizaron después de estimular las células con EGF (100ng/ml) 5 min., inmunoprecipitando con AU5 y utilizando MBP como sustrato. Paneles inferiores: niveles de las proteínas H-, K- y N-Ras monitorizados realizando WB con sus respectivos anticuerpos específicos; niveles de proteína HA-N17 y de las isoformas salvajes marcadas con el epítopo FLAG. En los paneles se indican los ratios de las señales HA/FLAG en un experimento representativo. B: Rescate por H-, K- y N-Ras wt de la inhibición de la activación de ERK2 causado por K-N17. C: Rescate por H-, K- y N-Ras wt de la inhibición de la activación de ERK2 causado por N-N17. Los experimentos muestran la media y la desviación estándar de al menos cinco experimentos independientes, en relación a los niveles de fosforilación detectados en las células control.

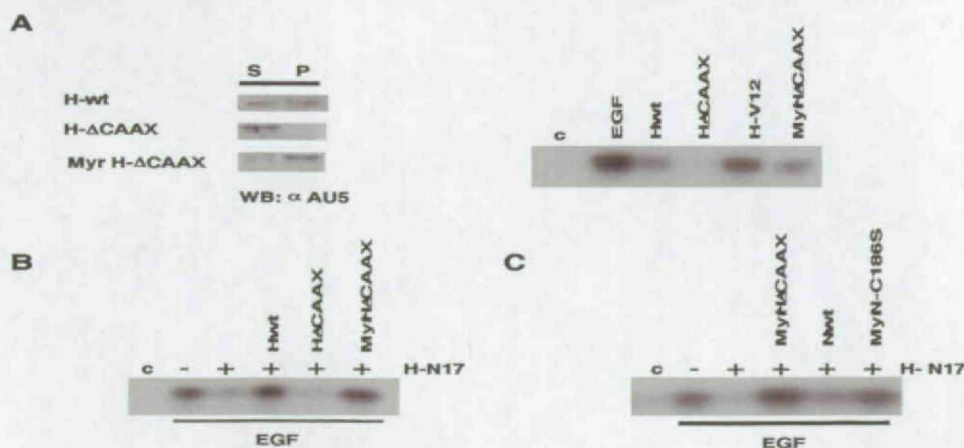
Los resultados de estos experimentos mostraron claramente que los mutantes Ras N17 presentan diferencias en sus especificidades inhibitorias. En el caso de H-N17, se observó que el bloqueo que acusaba de la activación de ERK2 inducido por EGF, únicamente era rescatado totalmente por H-Ras wt, mientras que K-Ras wt y N-Ras wt sólo producían un leve rescate de este efecto (12% y 16% respectivamente) (Fig. 3A). Estas diferencias en la capacidad de rescatar la inhibición de Ras, no eran debidas a diferencias en los niveles de expresión de las proteínas, ya que el ratio HA/FLAG era prácticamente idéntico en todos los casos. Con respecto a K-N17, el efecto inhibitorio sobre la activación de ERK2 era completamente rescatado por H-Ras wt, y en gran medida por K- Ras wt (alrededor del 79%), mientras que la expresión de N- Ras wt no producía ningún efecto (Fig. 3B). De forma similar, la inhibición de ERK2 debida a N- N17 era rescatada totalmente por N- Ras wt, mientras que H-Ras wt la rescataba en un 78%, pero no se veía afectada en absoluto por K- Ras wt (Fig. 3C). Estos resultados constituían la primera evidencia de que existen diferencias en las propiedades inhibitorias de los mutantes H-, K- y N- Ras N17.

#### **4.2.2. Estudio del papel de la señal de anclaje a membrana en la especificidad inhibitoria de H-, K- y N-Ras N17.**

Como se ha dicho en la introducción, las tres isoformas de Ras se diferencian principalmente en su extremo carboxi-terminal, donde se encuentra la secuencia CAAX, a través de la cual se anclan a la membrana plasmática, debido a la unión de un grupo farnesilo y una segunda señal que en el caso de H- y N-Ras consiste en uno o dos grupos palmitilos, mientras que K-Ras necesita un dominio de polibásico de seis polilisinas.. Tras los resultados del apartado anterior, decidimos continuar la investigación estudiando si la señal de anclaje a membrana estaba implicada en las capacidad de una determinada isoforma Ras de rescatar el efecto inhibitorio de su respectivo mutante. Para realizar este estudio, generamos una proteína H- Ras que carecía de cisteína 186 (H-ΔCAAX), a la que añadimos

en su extremo N-terminal la señal de miristilación de c-Src. Para permitir su detección se incluyó un epítipo AU5. De esta forma conseguimos sustituir una señal de modificación postraduccional de anclaje a membrana de Farnesilación/palmitilización por una de miristilación/palmitilización (Cadwallader et al. 1994).

Una vez generado el mutante procedimos a comprobar si era capaz de unirse a la membrana plasmática, para lo cual se expresó la proteína en células cos-7 y se realizó un fraccionamiento celular (ver materiales y métodos), después se utilizó el anticuerpo que tiene afinidad por el epítipo AU5 para ver en que fracción aparecía Myr-H- $\Delta$ CAAX. Como se ve en la figura 4A, en el caso de H- $\Delta$ CAAX que carece del sitio de farnesilación, la proteína aparecía exclusivamente en la fracción soluble, mientras que Myr-H- $\Delta$ CAAX aparecía localizado principalmente en la fracción particular, donde aparecen las proteína unidas a la membrana celular, lo que indicaba que este mutante era capaz de unirse a la membrana. A continuación, estudiamos si el cambio de la señal de anclaje a membrana afectaba a la capacidad de H-Ras de activar a ERK2, como se puede ver en la figura 4A, Myr-H- $\Delta$ CAAX sólo indujo una pequeña activación de ERK2, cuando se cotransfectaron en células Cos-7, esta activación era comparable a la que producía la proteína H- Ras salvaje. Sin embargo, cuando se cotransfectó H- $\Delta$ CAAX comprobamos que era totalmente incapaz de inducir la activación de ERK2(Fig.4A)



**Figura 4. Rescate de la inhibición de ERK2 debido a H-N17 por H-Ras miristilada. A. Panel izq:** Distribución celular de las proteínas mutantes H-Ras CAAX. Se transfectaron COS-



7 se transfectaron con H-Ras salvaje (wt), H- $\Delta$ CAAX, y Myr-H- $\Delta$ CAAX marcadas con el epítipo AU5; los lisados fueron fraccionados como se explica en Materiales y Métodos, y la se detectó la expresión de las proteínas mediante WB con anti-AU5. La calle S es la fracción soluble S100; la calle P es la fracción particular. Panel derecho: Activación de ERK2 por los mutantes H-Ras CAAX. Se realizaron ensayos de la actividad quinasa, como se indica en Materiales y Métodos, de células COS7 cotransfectadas con HA-ERK2 (1 $\mu$ g), y las distintas construcciones indicadas en la figura (500ng, 100ng para H-Ras V12), o estimuladas con EGF (100 ng/ml) durante 5 min. B: Rescate por Myr-H- $\Delta$ CAAX de la inhibición causada por H-N17. Se transfectaron células COS-7 con HA-ERK2 (1 $\mu$ g), con vector (calles c y -) y con 250 ng de H-N17 (calles +), junto con 500ng de los plásmidos que codifican para las distintas proteínas Ras donde se indica. Se realizó el ensayo de la actividad quinasa de las células tras estimular con EGF 5 min. inmunoprecipitando con HA y usando MBP como sustrato. C: Rescate de la inhibición debida a H-Ras N17 por N-Ras miristilada. Se transfectaron células COS-7 con HA-ERK2 (1 $\mu$ g), con vector vacío (calles c y -) y con 250 ng de H-N17 (+), junto con 500ng de los plásmidos que codifican para las distintas proteínas Ras indicadas. Se realizó el ensayo de la actividad quinasa de las células tras estimular con EGF 5 min. inmunoprecipitando con HA y usando MBP como sustrato.

A continuación se estudió si estas construcciones eran capaces de rescatar la inhibición ejercida por H-N17 sobre la activación de ERK2 inducida por EGF (figura 4B). Con este fin, se cotransfectaron células Cos-7 con HA-ERK2, junto con el plásmido que codifica para H-N17 y los mutantes Myr-H- $\Delta$ CAAX, H- $\Delta$ CAAX o H-Ras wt. Como se ve en la figura 4B, Myr-H- $\Delta$ CAAX rescató la inhibición de H-N17 al mismo nivel que H-Ras, por el contrario H- $\Delta$ CAAX no fue capaz de rescatar la inhibición. Estos resultados indicaban que la proteína Ras miristilada era tan eficiente como la proteína Ras salvaje farnesilada a la hora de rescatar los efectos inhibitorios del mutante H-N17.

A tenor de nuestros resultados, nos preguntamos si la sustitución de la señal de farnesilación por la de miristilación podía hacer que otras isoformas de Ras rescataran la inhibición debida al mutante H-N17 (Figura 4 C). Para comprobarlo, añadimos una señal de miristilación de c-Src al extremo N-Terminal de una construcción de N-Ras que carece de la señal de farnesilación, al tener sustituida la cisteína 186 por una serina (Myr-N-C186S). Esta construcción se transfectó en células Cos-7. Se realizó un ensayo de fraccionamiento celular, lo que permitió comprobar que Myr-N-C186S aparecía en la fracción particular. También pudimos comprobar que la expresión de esta construcción activaba débilmente a ERK2, en los mismos niveles que lo hacían N-Ras y H-Ras salvaje. Cuando se estudió si Myr-N-C186S era capaz de rescatar la inhibición de la activación de ERK2 debida a H-N17, quedó de manifiesto que, al contrario de lo que ocurría con N-Ras salvaje, que sólo rescataba mínimamente el efecto inhibitorio de H-N17, el mutante Myr-N-C186S era capaz de rescatar la represión de la activación de ERK2, aunque no de forma tan eficaz como Myr-H- $\Delta$ CAAX.

Estos resultados demostraron que la señal de modificación postraducciona l reside en el dominio hipervariable de las tres isoformas de Ras estaría determinando, de una



forma u otra, su especificidad a la hora de rescatar la activación de los mutantes dominantes inhibitorios.

#### **4.2.3. Efecto de los mutantes dominantes inhibitorios de Ras sobre el intercambio de nucleótidos en las tres isoformas de Ras.**

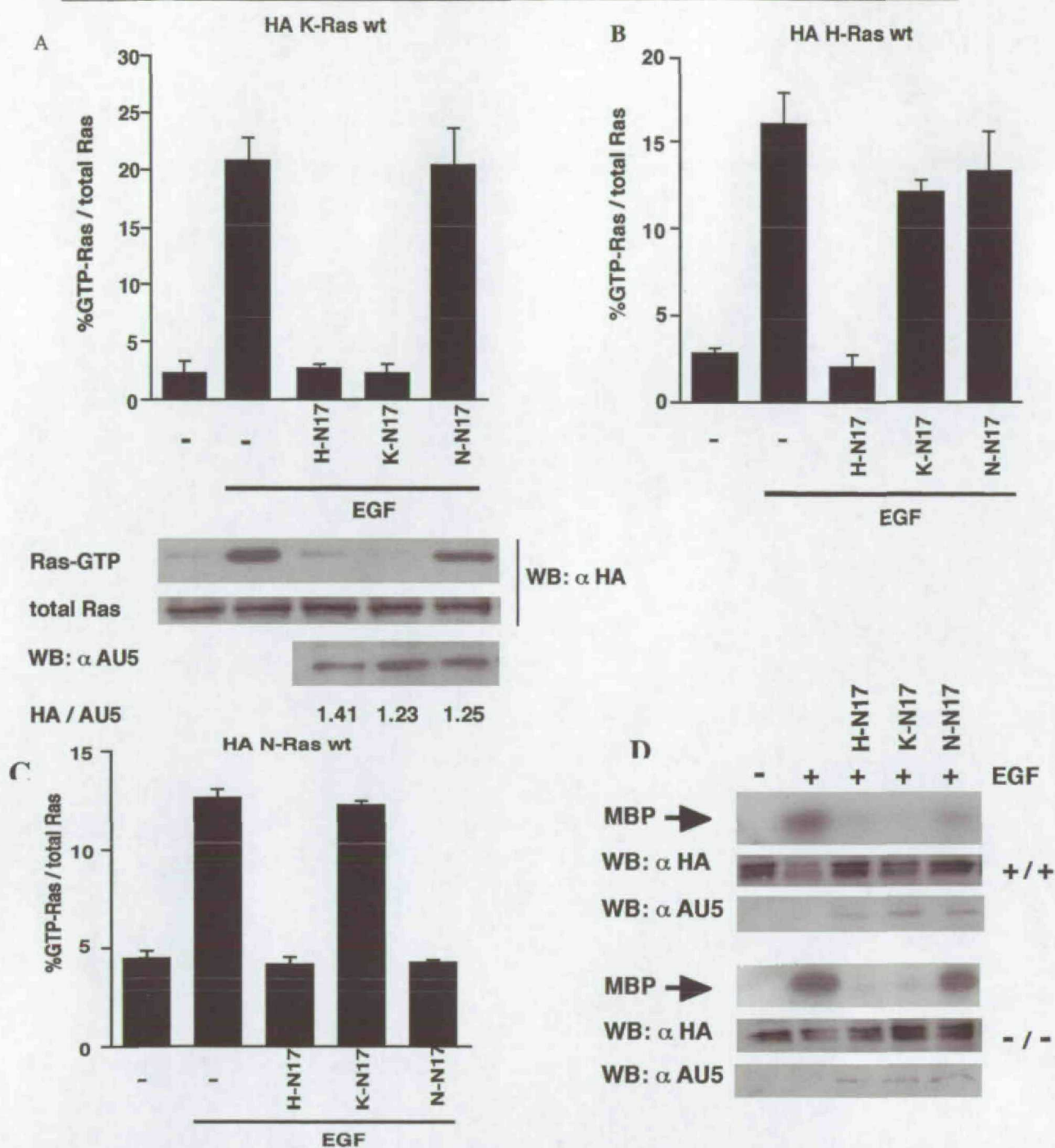
A tenor de los resultados de los apartados anteriores se decidió determinar hasta qué punto H-, K- y N-N17 eran capaces de inhibir la activación de H-, K- y N- Ras salvajes. Para este fin, se decidió estudiar cómo H-N17, K-N17 y N-N17 interferían directamente en el intercambio de GDP/GTP en H-, K- y N Ras salvajes inducido por EGF. Se cotransfectaron células Cos-7 con los mutantes Ras N17, junto con H-, K- y N-Ras wt etiquetados con el epítipo AU5 y con el epítipo HA respectivamente para monitorizar su expresión. Los lisados de estas transfecciones se utilizaron para realizar una serie de ensayos "pull-down" utilizando la proteína de fusión GST-Raf-RBD unida a glutation sefarosa, tal como se explica en el apartado 3.11.3 de los Materiales y Métodos. Esto permitió recoger las bolas de sefarosa-GST-Raf-RBD formando un complejo con HA-Ras-GTP. Los precipitados de Ras-GTP se monitorizaron realizando western-blots utilizando el anticuerpo anti-HA. Por otro lado se realizaron western-blots de los lisados totales para determinar la cantidad de Ras total, utilizando también anti-HA. La cantidad de HA-Ras-GTP relativizada con respecto a la de HA-Ras total permitió determinar el porcentaje de Ras activado por EGF. Una vez más, era de suma importancia controlar los niveles de expresión relativos de las proteínas HA-Ras salvajes y los mutantes dominantes inhibitorios AU5-Ras N17, con el objeto de descartar que los posibles efectos represores del intercambio de nucleótidos GDP/GTP fueran debidos a variaciones en los niveles de expresión de los mutantes Ras-N17 en relación a las proteínas Ras wt. Para lo cual, se calcularon los ratios de expresión HA/AU5, que se mostraron prácticamente constantes en todos los casos.

Comprobamos que el intercambio de nucleótidos inducido por EGF sobre K-Ras era completamente inhibido por H-N17 y K-N17 pero no por N-N17 (Fig. 5A). Por otro lado, la activación de H-Ras era potentemente inhibida por H-N17, mientras que K-N17 causó una inhibición del 22% y N-N17 sólo era capaz de inhibir el intercambio de nucleótidos en H-Ras wt en un 16%. De forma similar, el intercambio de GDP/GTP en N-Ras inducido por EGF era inhibido por H-N17 y por N-N17, mientras que K-N17 en las mismas condiciones experimentales, no parecía tener ningún efecto detectable (Figura 5B y C). Estos resultados confirmaron que existían diferencias notables en la especificidad inhibitoria de los tres mutantes Ras-N17.



#### 4.2.4 Efecto de H-N17, K-N17 y N-N17 sobre la activación de ERK2 por EGF en fibroblastos embrionarios de ratón N-ras $-/-$ .

En base a los resultados del apartado anterior, como N-N17 interfería con la señal de EGF inhibiendo específicamente la activación de N-Ras, sin afectar a K-Ras y afectando débilmente a H-Ras, se podía esperar, que en ausencia de expresión de N-Ras endógeno, la capacidad de N-N17 de disminuir la activación de ERK2 se vería significativamente disminuida. Para comprobar esta hipótesis decidimos utilizar fibroblastos embrionarios (MEF), procedentes de ratones que carecen del gen *N-ras*. Se cotransfectaron MEF procedentes de ratones knock-out de N-Ras ( $-/-$ ), con HA-ERK2 junto con los mutantes H-N17, K-N17 y N-N17 marcados con el epítipo AU5, las células se lisaron y se determinó el grado de activación HA-ERK2 debida a EGF, realizando ensayos de la actividad quinasa. Como control, se utilizaron células MEF procedentes de ratones normales ( $+/+$ ), hermanos de camada de los ratones knock-out de N-Ras. Se comprobó que los tres mutantes dominantes inhibitorios eran capaces de inhibir la activación de ERK2 por EGF el caso de los MEF N-Ras  $+/+$ , siendo K-Ras N17 el que causaba la mayor inhibición. Sin embargo, se comprobó que en los MEF N-Ras  $-/-$  existían diferencias en el comportamiento de los tres mutantes N-17, así mientras que H-N17 y K-N17 inhibían la activación de ERK2 por EGF del mismo modo que lo hacían en los MEF  $+/+$ , N-N17 se mostró incapaz de inhibir la activación de ERK2 (Fig. 5D), a pesar de que se comprobó, utilizando el anticuerpo anti-AU5, que los niveles de expresión de los tres mutantes N-N17 era similar. Estos resultados son una nueva demostración de que los efectos inhibitorios de N-N17 están mediados principalmente por N-Ras.



**Figura 5. Inhibición del intercambio de nucleótidos en las distintas isoformas de Ras debido a los mutantes H-, K- y N- Ras N17.** A: Inhibición del intercambio de nucleótidos en K-Ras por los mutantes H-, K- y N-N17. La cantidad de Ras-GTP se determinó como se describe en Materiales y Métodos, estimulando 5 min. con EGF (100ng/ml), células COS-7 cotransfectadas con HA-K-Ras (250ng) en presencia del vector vacío (-) o de H-N17, K-N17 y N-N17 (250 ng) de cada uno donde se indica. Panel superior Niveles de HA-K-Ras-GTP en un experimento representativo, monitorizado con anti-HA en precipitados por afinidad con GST-RafRBD. Panel intermedio: cantidad de K-Ras en los lisados totales



(Figura 5 continuación), monitorizado con anti-HA. Panel inferior: Niveles de proteínas AU5 H-N17, K-N17 y N-N17 monitorizados con anti-AU5. Los números indican el ratio HA/AU5 en un experimento representativo. B: Inhibición del intercambio de nucleótidos en H-Ras debida a los mutantes H-N17, K-N17 y N-N17. Los valores se obtuvieron como se explica más arriba. C: Inhibición del intercambio de nucleótidos en N-Ras debida a los mutantes H-N17, K-N17 y N-N17. Los valores de A-C muestran las medias y desviaciones estándar de al menos 5 experimentos. D: Efecto de los mutantes dominantes inhibitorios de Ras sobre la activación de ERK2 debida a EGF en MEFs con N-Ras deletado. Se cotransfectaron transitoriamente MEFs procedentes de ratones Knock-out de N-Ras(-/-), o MEFs de ratones normales procedentes de la misma camada (+/+), con HA-ERK2 (1µg) con H-N17, K-N17 y N-N17 (250 ng respectivamente) marcadas con el epítipo AU5. Se estimularon las células con EGF 5 min. (+), y se ensayó la actividad quinasa como se ha explicado antes. Paneles inferiores: Niveles de HA-ERK2 y de los mutantes marcados con AU5 determinados por WB con anti-HA y anti-AU5.

### **4.3 PAPEL DE LA SUBLOCALIZACIÓN DE RAS EN DOMINIOS DE MEMBRANA EN LA ESPECIFICIDAD DE LOS MUTANTES DOMINANTES INHIBITORIOS.**

Los resultados de los apartados anteriores junto con datos procedentes de los trabajos de otros grupos (Prior et al. 2001; Roy et al. 1999), nos hicieron pensar que las distintas especificidades de inhibición mostrada por los mutantes H-, K- y N- Ras N17, podían tener relación de algún modo con el patrón de distribución de las tres isoformas de Ras en distintos microdominios de membrana, por lo que decidimos realizar una serie de experimentos que nos permitieran comprobar esta hipótesis.

#### **4.3.1 Estudio de la localización de N-Ras en la membrana plasmática.**

Como se ha explicado en la introducción, la compartimentalización de H-Ras y de K-Ras está bien documentada en diversos trabajos publicados en los últimos años. Estos trabajos han establecido que H-Ras aparece localizado principalmente en "lipid rafts" (Prior et al. 2001; Roy et al. 1999; Kranenburg et al 2001; Apolloni et al 2000), tanto caveolares como no caveolares, y que K-Ras está localizado en membrana desordenada. Sin embargo, hasta la fecha no se había realizado ningún estudio en profundidad para determinar la distribución de N-Ras. Por ello, como una primera aproximación para establecer la naturaleza de los dominios de membrana a los que aparece asociado N-Ras, se realizó un ensayo de solubilidad de en Tritón X-100. Los dominios lipid rafts son zonas de membrana altamente organizada ricas en esfingolípidos y colesterol e insolubles en Tritón X-100, además de tener una baja densidad. Estas características permiten que se pueda determinar que proteínas están localizadas en estos microdominios realizando fraccionamientos en gradientes de sacarosa de membranas solubilizadas en Tritón X-100. Para este fin, transfectamos células Cos-7 con las construcciones que codifican para las tres proteínas Ras marcadas con el epítipo HA, solubilizando las membranas con Tritón X-100 al 0.25%. Después se realizó fraccionamiento por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y se determinó la solubilidad de las tres isoformas en el detergente. Como se ve en



la figura 6, el 75-80% de N-Ras apareció en las fracciones de menor densidad. Para comprobar que en estas fracciones se habían recogido los lipid Rafts se monitorizó la presencia de la proteína caveolina-1, que se utilizó como marcador de lipid rafts , para lo que se utilizó un anticuerpo específico. Como se puede ver, N-Ras colocalizó mayoritariamente con la caveolina-1 en las mismas fracciones. En el caso de K-Ras se comprobó que aparecía completamente solubilizada en 0,25% de tritón X-100 ya que aparecía localizado en las fracciones de alta densidad y no colocalizaba con caveolina-1. Por su parte H-Ras, como ya estaba descrito, también apareció en las fracciones de baja densidad y colocalizó con caveolina confirmando su localización mayoritaria en lipid rafts. Estos resultados indican que N-ras presenta una asociación preferente con los dominios lipid Rafts.



**Figura 6. Asociación de N-Ras a lipid rafts.** Se transfectaron células COS-7 con HA-K-Ras y HA-N-Ras. Las células se solubilizaron en 0.250% de Tritón X-100 y se obtuvieron fracciones en gradiente de sacarosa como se explica en Materiales y Métodos. La presencia de las isoformas de Ras en las distintas fracciones se monitorizó con anti-HA realizando WB. La presencia de caveolina identifica las fracciones de lipid rafts, por lo que se monitorizó su presencia mediante el uso de anti-caveolina 1

4.3.2Estudio de la localización de N-RAS

Los resultados de los experimentos del apartado anterior indicaban que N-Ras estaba localizado principalmente en dominios de membrana tipo lipid rafts, pero los fraccionamientos en gradientes de sacarosa de membranas solubilizadas en Tritón X-100 no permiten discriminar si esta isoforma de Ras está unida a lipid rafts exclusivamente o si se une también a caveolas.

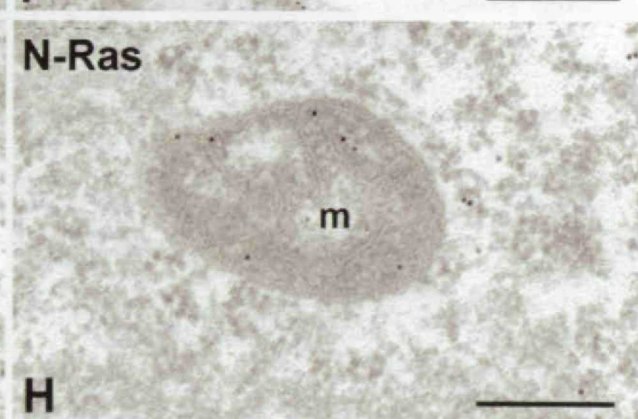
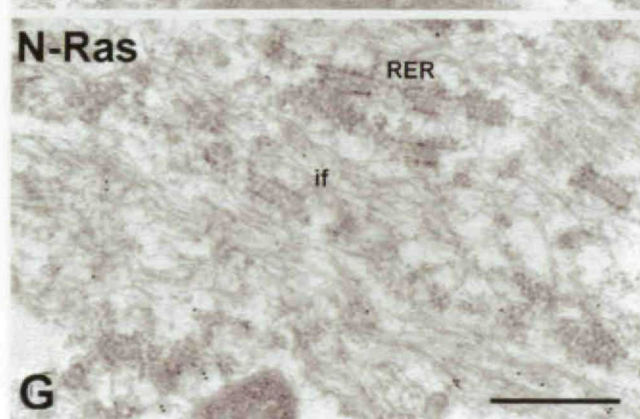
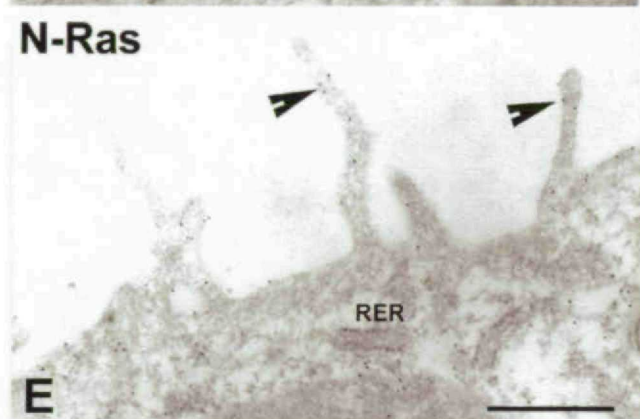
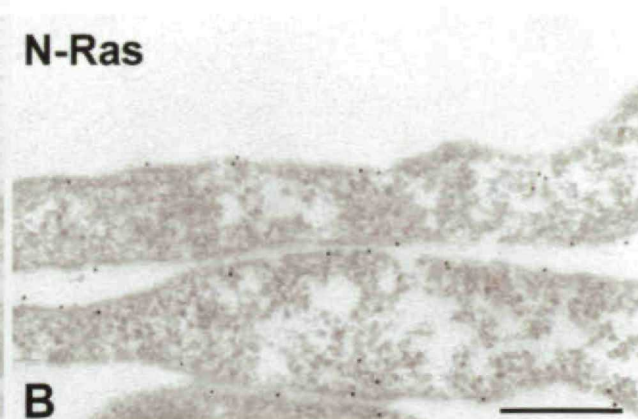
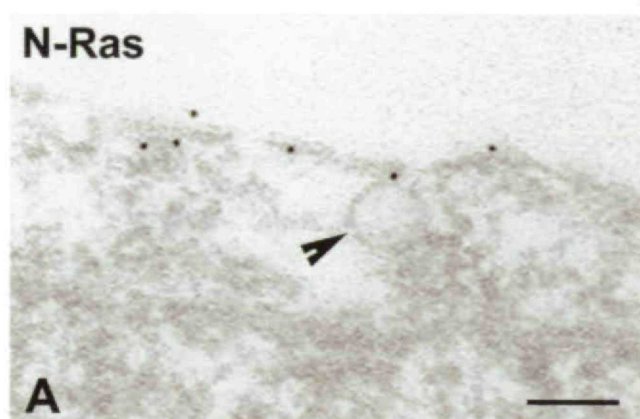
Para realizar un estudio más detallado de la distribución ultraestructural de N-Ras, decidimos utilizar técnicas de microscopía electrónica. Para ello se utilizaron células MDCK transfectadas con construcciones que codifican proteínas quiméricas de la proteína fluorescente verde (GFP) fusionada con el dominio C-terminal hipervariable de N-Ras o con la proteína Ras completa. Estas células fueron analizadas mediante el uso de inmunomicroscopía electrónica, marcando las quimeras con anticuerpos específicos para el



epítopo GFP conjugados a partículas de oro. Para evitar posibles localizaciones artefactuales debidas a una sobreexpresión exagerada de las construcciones, decidimos utilizar bajos niveles de expresión, razón por la cual se utilizaron cultivos en los que se observaba por western blot una expresión clara de la proteína quimérica, utilizando para monitorizar los niveles la señal anti-GFP, pero en los que al usar el anticuerpo específico para anti-N-Ras, no se viera una expresión de más de dos veces mayor de la proteína ectópica con respecto a los niveles normales de expresión endógena de N-Ras. GFP-N-Ras aparecía claramente localizado en áreas electro-densas de la membrana plasmática, tanto en el soma celular como en las estructuras diferenciaciones de membrana. (Fig. 7A,B). Sin embargo, no se observó marcaje específico de caveolas (fig7 A, flecha), mientras que en células transfectadas con GFP-H-Ras, H-Ras aparecía claramente localizado en membranas de caveolas. El análisis comparativo de la distribución subcelular de GFP-N-Ras y de GFP-H-Ras mostró que ambas proteínas de fusión eran detectables en áreas electro-densas de la membrana plasmática. Curiosamente una alta densidad de partículas de oro aparecían concentradas en los dominios de membrana que forman la unión de los filopodios (flechas en fig. 7d,e y f). Como ocurría con GFP-N-Ras, algunas partículas de oro aparecían agrupadas en distintas áreas del citosol ricas en filamentos intermedios, pero en ningún caso se observó marcaje de las membranas de retículo endoplasmático rugoso (fig. 7D,G). Con respecto al citoplasma, las partículas de oro de los anticuerpos inmunorreactivos con la proteína GFP-N-Ras aparecían principalmente distribuidas en las mitocondrias (Fig7H) y eran particularmente intensas en áreas ricas en haces de filamentos intermedios (Fig. 7G If). No se vieron diferencias en la localización celular de células MDCK transfectadas con la construcción que codifica para la proteína quimérica GFP-N-Ras HVR, en la que la GFP está unida a la región hipervariable de N-Ras, con respecto a las transfectadas con GFP-N-Ras.

**Figura 7 (página siguiente). Localización de GFP-N-Ras por microscopía electrónica en células MDCK, utilizando anticuerpo contra la GFP y un anticuerpo secundario conjugado con partículas de oro coloidal de 10 nm.** Se observó marcaje de GFP-N Ras en áreas electro-densas de la membrana plasmática (A y B). Una caveola (flecha en A) aparece libre de marcaje. Sin embargo H-Ras aparece localizado en una caveola (flecha en C) Había una notable concentración de H-Ras marcado con oro en el extremo de una diferenciación de membrana (flecha en D). Tanto GFP-N-Ras como GFP-H-Ras aparecían claramente distribuidos en la membrana plasmática con una mayor concentración en la membrana de los filopodios (E y F). En el citoplasma, algunas partículas de moléculas de N-Ras aparecía marcadas con oro en el citosol en áreas ocupadas por filamentos intermedios (if en G). También se observaron partículas de oro en la matriz mitocondrial (M). No se vio marcaje de las membranas de retículo endoplasmático rugoso (RER en D,E y G). Las barras de escala indican 100 nm en A y C; 300 nm para el resto







Los resultados de estos dos apartados indican que N-Ras está localizado en microdominios de membrana del tipo lipid rafts, sin que sea posible detectar su presencia en zonas de membrana desordenada ni en caveolas.

#### **4.4 EFECTO DE LOS MUTANTES Ras N17 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE ERK2 INDUCIDA POR ESTÍMULOS MITOGÉNICOS Y EFs DE RAS**

Nuestros resultados demostraban que los mutantes dominantes inhibitorios Ras-N17 tenían especificidad de inhibición, por lo que decidimos utilizarlos para bloquear diferencialmente la activación de ERK2, por distintos estímulos mitogénicos y distintos intercambiadores de nucleótidos que actúan sobre las distintas proteínas de esta familia,

##### **4.4.1 Efecto de los mutantes dominantes inhibitorios sobre la activación de ERK2 mediada por estímulos mitogénicos.**

En primer lugar se decidió estudiar la especificidad inhibitoria de los tres mutantes N17 sobre la activación de ERK2 debida a distintos estímulos mitogénicos. Para realizar este estudio utilizamos células NIH3T3 cotransfectadas transitoriamente con la construcción que codifica HA-ERK2 y los mutantes H-N17, K-N17 y N-N17 y se estimularon los cultivos con PDGF o con LPA. Como se ve en la figura 8a, la activación de ERK2 por PDGF era inhibida intensamente cuando se expresaban los mutantes H-N17 y K-N17 mientras que el mutante N-17 no parecía tener ningún efecto sobre la activación de esta quinasa.

Cuando se estimuló la activación de ERK2 con LPA, los mutantes dominantes inhibitorias de Ras se mostraron capaces de reprimir esta activación en distinto grado, siendo K-Ras N17 el que mostró un mayor efecto inhibitorio.

##### **4.4.2 Efecto de H-,K- Y N17 sobre la activación de ERK2 mediada por factores intercambiadores de nucleótidos de Ras.**

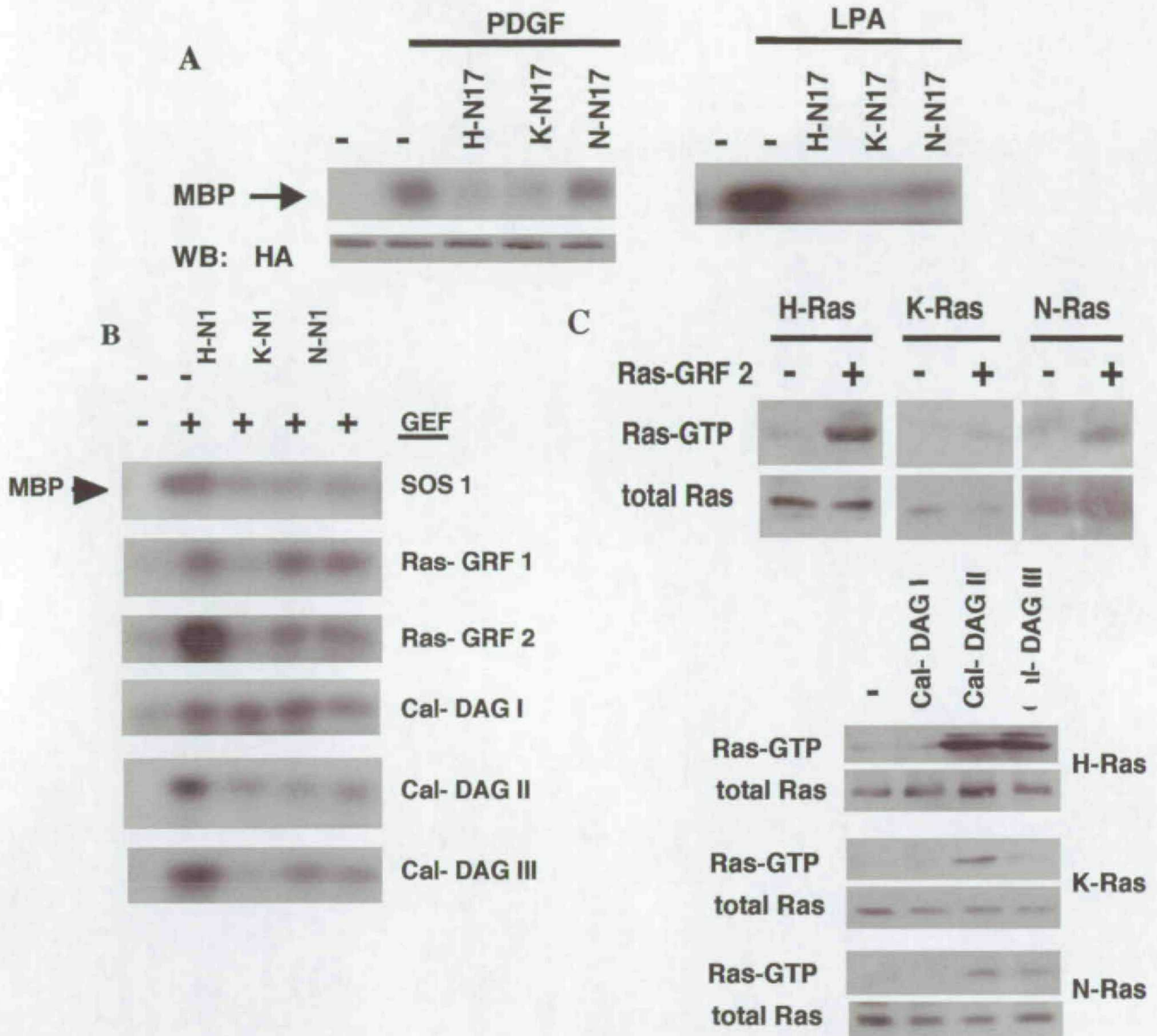
Del mismo modo que en el apartado anterior, se cotransfectó HA-ERK2 junto a los mutantes dominantes inhibitorios de Ras y distintos factores de intercambio de nucleótidos de la familia de proteínas Ras, para ver si la estimulación de ERK2 mediada por estos factores se veía afectada por la expresión de los distintos Ras N17. El primer EF que decidimos utilizar fue SOS1, que junto a SOS 2 forma una familia de expresión ubicua, que *in vivo* es capaz de catalizar el intercambio de nucleótidos en las tres isoformas de Ras. También se transfectaron Ras-GRF1, que *in vivo* sólo induce intercambio de nucleótidos

sobre H-Ras, y Ras-GRF2. Por último se transfectaron los tres miembros de la familia CAL-DAG/GRP, que se caracterizan por tener un dominio de unión a calcio y diacilglicerol.

De este modo se comprobó que la activación de ERK2 mediada por SOS1 era bloqueada de forma parecida por los tres mutantes dominantes inhibitorios, como se ve en la figura 8b. Sin embargo, en el caso de Ras-GRF1 sólo H-N17 mostró capacidad de reprimir la activación de ERK2 mientras que los mutantes K-N17 y N-N17 no demostraron tener ningún efecto. Cuando se contranfectó Ras-GRF2, se vio que como en el caso anterior, H-N17 fue capaz de inhibir fuertemente la activación de ERK2 mediada por este factor de intercambio, pero como se puede ver en la figura 8B, K-N17 y N-N17 fueron capaces de inhibir de forma patente la activación de ERK2, aunque sin llegar al grado de represión producido por la expresión de H-N17. En el caso de CAL-DAG I el efecto estimulador de ERK2 de este factor de intercambio no se vio alterado en modo alguno por la expresión de ninguno de los mutantes dominantes inhibitorios de Ras, lo que resultó altamente interesante. Por el contrario, CAL-DAG II mostró un comportamiento similar al de SOS1, ya que su capacidad de estimular la activación de ERK era drásticamente inhibida por la expresión de los mutantes H-N17, K-N17 y N-17. Por último, cuando se expresó CAL-DAG III en presencia de H-17 se observó que no había activación de ERK2, mientras los mutantes K-N17 y N-N17 mostraban una capacidad inhibitoria sensiblemente menor.

Estos resultados en conjunto, pusieron claramente de manifiesto que los mutantes H-N17, K-N17 y N-N17, tenían efectos inhibitorios distintos sobre la mayor parte de los factores de intercambio de nucleótidos de Ras descritos hasta la fecha.





**Figura 8. Efectos de los mutantes dominantes inhibitorios de Ras sobre la activación de ERK2 debida a estímulos mitogénicos y EFs activadores de Ras.** A: Efectos de los mutantes dominantes inhibitorios de Ras sobre la activación de ERK2 debida mitógenos. Se transfectaron células NIH3T3 transitoriamente con HA-ERK2 (1µg), junto con H-N17, K-N17 y N-N17 marcadas con el epítipo HA (250 ng de cada una). Las células se estimularon con PDGF (10ng/ml) o con LPA (10µM) durante 5 min. donde se indica, y se realizaron ensayos de la actividad quinasa como se ha explicado antes. Panel inferior: Niveles de HA ERK2 determinados por WB usando anti-HA. B: Efectos de los mutantes Ras N17 sobre la activación de ERK2 estimulada por distintos Ras-EFs. Se transfectaron células COS-7 con HA-ERK2 (1µg), junto con H-N17, K-N17 y N-N17 marcadas con el epítipo HA (250 ng de cada una), más distintos Ras-EFs (0,5 µg), donde se indica (+). Los ensayos de la actividad quinasa se realizaron como se ha explicado anteriormente. C: Intercambio de GDP/GTP en H-, K- y N-Ras debido a distintos EFs. La cantidad de Ras-GTP se determinó como se explica en materiales y métodos, usando células COS-7 cotransfectadas con el EFs indicado en cada caso (0,5 µg) y las distintas proteínas Ras salvajes marcadas con el epítipo HA (1µg) donde se indica.

#### **4.4.3 Estudio de la capacidad de intercambio de nucleótidos en las tres proteínas Ras mediado por distintos factores de intercambio de nucleótidos.**

Para poder realizar una mejor interpretación de los resultados del apartado anterior, decidimos estudiar la capacidad de los factores de intercambios utilizados para inducir intercambio de nucleótidos de guanina sobre las distintas isoformas de Ras. Para ello, se cotransfectaron células COS-7 con HA-H-Ras, HA-K-Ras y HA-N-Ras, junto con los distintos factores de intercambio de Ras y se monitorizó la inducción de intercambio GDP/GTP debida a cada factor, realizando ensayos de precipitación por afinidad de Ras-GTP, utilizando la proteína de fusión GST-Raf-RBD.

Como se ve en la figura 8C, se observó que SOS1 era capaz de inducir intercambio de nucleótidos en las tres isoformas de Ras, lo que está de acuerdo con resultados previos ampliamente descritos en la literatura. Sin embargo Ras-GRF1 sólo se mostraba capaz de inducir la activación de H-Ras. Por otro lado, se vio que Ras GRF2 inducía un potente intercambio de GDP/GTP en H-Ras, y en un menor nivel en N-Ras y K-Ras. En el caso de los miembros de la familia CAL-DAG, también pudimos comprobar la existencia de diferencias de especificidad. Así CAL-DAG II se mostraba capaz de inducir intercambio de nucleótidos en las tres isoformas de forma muy potente. Sin embargo, CAL-DAG III mostró diferencias a la hora de catalizar el intercambio de GDP/GTP, siendo sensiblemente más eficiente sobre H-Ras y N-Ras que sobre K-Ras. Por el contrario, CAL-DAG I no inducía intercambio de nucleótidos sobre ninguna de las isoformas de Ras.

Los experimentos de este apartado junto con los del anterior, nos hicieron pensar que a pesar de que las tres isoformas de Ras comparten la mayor parte de sus factores de intercambio conocidos hasta la fecha, las especificidades inhibitorias de los mutantes H-, K- y N-Ras N17 sobre los factores de intercambio que hemos utilizado, son marcadamente distintas. Es más, teniendo en cuenta los resultados de esta tesis en conjunto nos permitió pensar que los efectos inhibitorios debidos a estos mutantes inhibitorios podrían deberse a la compartimentalización de las tres isoformas de Ras en la membrana plasmática.



## **5. DISCUSIÓN**

## 5. DISCUSIÓN

En esta tesis hemos investigado las especificidades inhibitorias que presentan los mutantes dominantes negativos H-Ras, K-Ras4B y N-Ras N17. Hemos observado que H-N17, K-N17 Y N-N17 presentan importantes diferencias en su capacidad para inhibir la activación de ERK2 y el intercambio de nucleótidos inducido por EGF en H-Ras, K-Ras4B y N-Ras. Una posible explicación a este comportamiento sería que los tres mutantes dominantes inhibitorios de Ras presentan diferencias en su afinidad por los factores de intercambio de nucleótidos activados por EGF, responsables de activar a la distintas isoformas de Ras. De los factores de intercambio de nucleótidos de Ras descritos hasta la fecha, únicamente SOS 1-2 y Ras-GRF2 se expresan ubicuamente (Botwell et al. 1992; Fan et al. 1997). En las células COS-7, el modelo experimental que hemos utilizado para la realización de la mayor parte de los estudios bioquímicos de este trabajo, no hemos detectado expresión de Ras-GRF2. Además, Ras-GRF2 se activa principalmente a través de receptores acoplados a proteína G, no por receptores tirosin quinasa como el receptor de EGF (Fan et al. 1997). Así, cabe esperar que los efectos debidos a la estimulación de las células COS-7 con EGF descritos a continuación, sean mayoritariamente mediados por SOS1, aunque también hay que tener en cuenta la posibilidad de que existan otros factores de intercambio de nucleótidos sin describir todavía participando en este proceso.

Hasta la fecha, no se ha realizado ningún estudio comparativo de la afinidad de unión que presenta SOS por H-, K- y N-Ras. De todas maneras no se espera que haya grandes diferencias. Primero porque con respecto a la estructura del complejo SOS-Ras, se ha puesto de manifiesto que los aminoácidos de Ras que intervienen en la unión a SOS son idénticos en H-, K- y N-Ras (Boriack-Sjodin et al 1998). Segundo, cualquier diferencia en la afinidad de unión de SOS a las tres isoformas de Ras sería reflejada por la eficiencia con que SOS estimularía el intercambio de nucleótidos en H-, K- y N-Ras *in vitro*. De hecho, se sabe que SOS induce el intercambio de nucleótidos sobre las tres isoformas de Ras de forma jerárquica H-Ras > N-Ras > K-Ras (Jaumot et al. 2002), pero estas variaciones observadas en la capacidad de SOS para inducir la activación de las distintas isoformas de Ras son muy pequeñas. Esto mismo ocurre con otros factores de intercambio de nucleótidos como Ras-GRF, en este caso las diferencias del potencial activador de este EF sobre las distintas isoformas de Ras no son nunca mayores a dos veces (Lenzen et al. 1998). Considerando estos datos, no parece probable que posibles diferencias en la afinidad por las tres isoformas de Ras, de los factores de intercambio de nucleótidos de esta familia, sean la explicación para las grandes diferencias que se observan de en la capacidad de los



mutantes H-, K- y N-Ras N17 de inhibir las funciones de Ras en células estimuladas con EGF.

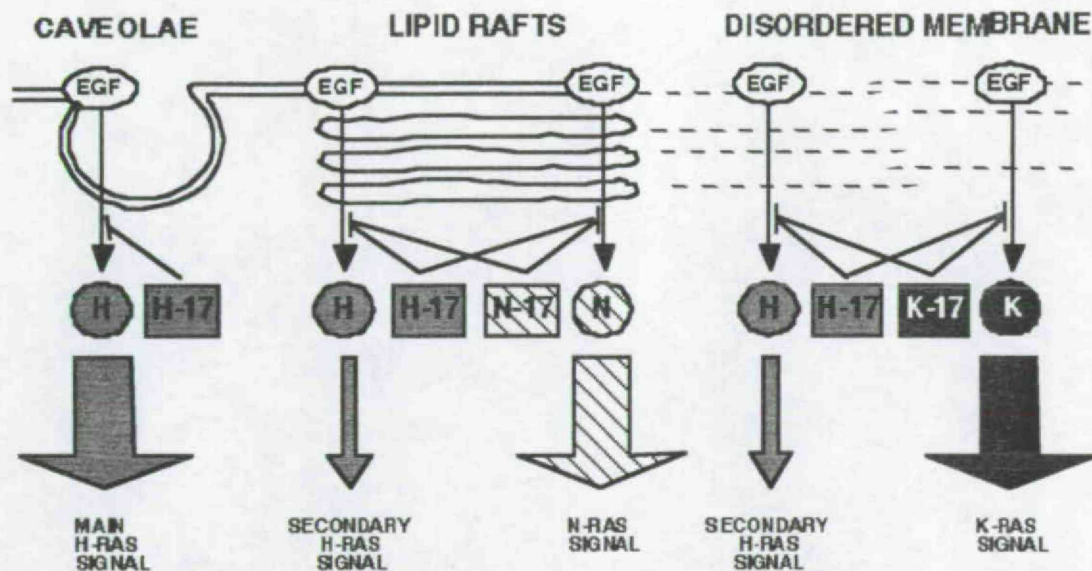
Se puede proponer una explicación alternativa, utilizando la información recogida en el trabajo de distintos grupos en los últimos tiempos, en los que se describe la compartimentalización de las proteínas Ras en distintos dominios de la membrana plasmática (Prior y Hancock 2001). Se ha descrito que H-Ras aparece distribuida prácticamente a partes iguales en dominios de membrana lipid rafts caveolares y no caveolares, así como en membrana desordenada. Por otro lado, en estos trabajos se ha observado que K-Ras aparece localizada principalmente en membrana desordenada (Prior et al. 2001; Apolloni 2000; Roy et al 1999). Un Trabajo reciente, describe la presencia de K-Ras en caveolas (Kranenburg et al. 2001), sin embargo esta conclusión está basada en imágenes de microscopía confocal, en las que según estos autores habría colocalización de K-Ras con caveolina, algo que no han podido demostrar los resultados anteriores, realizados mediante la utilización de técnicas de microscopía electrónica, que ofrece una mayor resolución y permite poner en duda los resultados obtenidos por microscopía confocal.

En este trabajo hemos realizado el primer estudio sobre la localización de N-Ras, hemos encontrado que aparece localizado principalmente en dominios de membrana tipo lipid rafts, sin embargo, no se ha observado su presencia en caveolas, en contra de lo que afirmaban trabajos anteriores realizados, de nuevo, mediante técnicas de microscopía confocal (Kranenburg et al. 2001). Nuestros resultados indican que N-Ras también colocaliza con H-Ras en la membrana plasmática, en los ápices de los filopodios y otras prolongaciones membranosas. Por otro lado, hemos observado la presencia de N-Ras en mitocondrias, lo que está de acuerdo con resultados ya publicados, en los que se demostró que esta isoforma estaba presente en preparaciones muy puras de mitocondrias (Rebollo et al. 1999), lo que podría estar directamente relacionado con la señal antiapoptótica generada por N-Ras en células en estado basal (Wolfman et al 2000). Algo que resulta interesante es la colocalización de N-Ras con filamentos intermedios en el citoplasma, lo que hasta ahora no había sido descrito por lo que se pensaba que la única isoforma de Ras asociada a citoesqueleto era K-Ras. Posiblemente la presencia de N-Ras en las últimas fracciones del gradiente de sacarosa (aproximadamente un 20%), se deba a las moléculas de N-Ras localizadas en mitocondrias y asociadas a filamentos.

Basándonos en la consabida distribución de las tres isoformas de Ras en distintos microdominios de membrana, hemos establecido un modelo, expuesto en la figura 1, para explicar nuestros resultados sobre las propiedades inhibitorias de los mutantes dominantes



inhibitorios H-, K- y N-Ras N17. Como ya se ha explicado anteriormente, H-Ras aparece localizado en caveolas, en lipid rafts no caveolares, donde colocaliza con N-Ras, y en membrana desordenada, donde colocaliza con K-Ras. Por ello creemos, que es concebible que H-N17 se encuentre localizado en todos estos compartimentos de la membrana celular, ya que su señal de anclaje a membrana es idéntico al de la proteína salvaje. Por la misma razón, es de esperar que K-N17 aparezca únicamente localizado en membrana desordenada, mientras que N-N17 estaría limitado exclusivamente a microdominios de membrana del tipo lipid rafts no caveolares. Aunque H-Ras se distribuye por igual en las distintas localizaciones, hay evidencias que sugieren que la activación inicial de H-Ras tiene lugar en caveolas (Prior et al 2001; Roy et al 1999; Mineo et al. 1996; Liu et al 1996; Liu et al 1997). No obstante, aunque la activación principal de H-Ras ocurra en caveolas, la presencia de esta isoforma en membrana desordenada y lipid Rafts hace pensar en una señal secundaria mediada por H-Ras, menos intensa en estos dominios, donde también tendría lugar la activación de N-Ras y de K-Ras.



**Figura 1. Modelo de los efectos de los efectos de los mutantes dominantes inhibitorios de Ras en distintas microlocalizaciones de membrana plasmática.** H-Ras estaría presente en caveolas, en lipid rafts no caveolares, donde colocalizaría con N-Ras, y en dominios de membrana desordenada junto con K-Ras. Así, H-Ras N17 estaría presente en todas estas localizaciones. K-Ras N17 estaría restringido a dominios de membrana desordenada, mientras que N-Ras N17 estaría limitado a dominios de tipo lipid rafts no caveolares. Debido a esto, H-Ras N17 podría inhibir la señal principal de H-Ras en caveolas la activación de la señal secundaria de H-Ras y de N-Ras en lipid rafts y la activación de otra señal secundaria de H-Ras y de K-Ras en membrana desordenada. Por otro lado, el efecto inhibitorio K-Ras N17 estaría limitado a dominios de membrana desordenada, donde bloquearía la señal secundaria mediada por las moléculas de H-Ras localizado en estos microdominios, así como la señal de K-Ras. De forma parecida, N-Ras N17 inhibiría la activación de su respectiva isoforma salvaje y la activación de la señal de H-Ras debida a las moléculas localizadas en estos dominios de membrana.



Por esto pensamos que H-N17 estaría bloqueando la activación de la señal principal de H-Ras en caveolas. La señal de N-Ras en lipid rafts y otra señal secundaria de H-Ras, sería inhibida por la población de H-Ras N17 localizada en estos microdominios. Mientras, las moléculas del mutante dominante inhibitorio H-Ras N17 localizadas en dominios de membrana desordenada estarían ejerciendo el efecto inhibitorio sobre K-Ras y sobre otra señal secundaria de H-Ras. Esto concuerda con nuestros resultados que demuestran que la inhibición debida a H-N17 es ampliamente rescatada por la sobreexpresión de H-Ras salvaje, que es capaz de restituir la señal de H-Ras en todas sus localizaciones. Sin embargo, la inhibición de H-N17 es rescatada ligeramente por la sobreexpresión de K-Ras (12%), que estaría restaurando la señal en la membrana desordenada; por su parte N-Ras rescata también ligeramente la señal de H-Ras (16%), al restablecerse la señal en lipid rafts.

En el caso del mutante K-N17, se observa una inhibición total de la señal de K-Ras y una disminución parcial de la de H-Ras (22%), ya que solo puede interferir con la señal mediada por H-Ras en membrana desordenada. Debido a que K-Ras no está presente en lipid rafts la activación de N-Ras no se ve afectada por la presencia de K-N17. Por esta razón, el efecto inhibitorio debido a la expresión de K-N17 está limitado a la membrana desordenada, por lo que de acuerdo con nuestro modelo, cabe esperar que sólo pueda ser rescatada por la sobreexpresión de las isoformas de Ras que localizan en membrana desordenada esto es, H-Ras y la propia K-Ras, lo que concuerda plenamente con nuestros resultados.

De forma parecida, el mutante dominante inhibitorio N-N17 inhibe completamente la activación mediada por su forma salvaje y bloquea la señal debida a la porción de H-Ras localizada en lipid rafts (16%). Nosotros observamos que la sobreexpresión de las formas salvajes de H-Ras y N-Ras compensan el efecto inhibitorio de N-N17, que tiene lugar exclusivamente en lipid rafts lo que concuerda de nuevo con el modelo que hemos elaborado. Como N-N17 no está presente en membrana desordenada, no tiene ningún efecto sobre la activación de K-Ras salvaje. El modelo que proponemos relaciona nuestros resultados sobre las propiedades de los mutantes dominantes inhibitorios de Ras, con la idea de que las funciones específicas de las distintas isoformas de Ras se deberían principalmente a que estas proteínas están localizadas en distintos microdominios de la membrana plasmática. Estos datos, obtenidos utilizando como modelo células COS-7, son fuertemente apoyados por nuestros resultados obtenidos en fibroblastos que carecen del gen *N-ras*. En este modelo celular, demostramos que la ausencia de la proteína N-Ras endógena disminuye drásticamente los efectos inhibitorios de N-N17 sin afectar los de H-N17 y K-N17.



Nuestros resultados demuestran también, que la sustitución en H-Ras de la señal de farnesilación por una señal de miristilación no afecta a la capacidad de la proteína H-Ras miristilada/palmitilada resultante para rescatar el efecto inhibitorio de H-N17. También es interesante que el cambio en N-Ras de la señal de anclaje de farnesilación por una señal de miristilación potencia también la capacidad de esta isoforma para rescatar la inhibición debida a H-N17. Una posible explicación para este fenómeno, vendría apoyada por resultados recientes que apuntan a que H-Ras miristilado se distribuye en la membrana plasmática del mismo modo que H-Ras salvaje (Jaumot et al. 2002). En el caso de N-Ras miristilada, lo que estaría ocurriendo es que aumentaría la concentración de N-Ras en dominios de membrana del tipo lipid rafts caveolares, permitiendo que colocalizara con H-N17 en estas estructuras, posibilitando así un rescate más eficiente del efecto inhibitorio de H-N17. Estos resultados demuestran que la distinta localización de H-Ras y N-Ras en los microdominios de membrana dependen fundamentalmente de las distintas modificaciones que sufren en su extremo C-terminal durante el proceso de modificación postranscripcional.

Nuestros resultados sólo nos permiten establecer un modelo de lo que ocurre en la membrana plasmática, pero el hecho de que distintos trabajos hayan demostrado que H-Ras aparece localizado en endomembranas de forma estable y funcional, haría necesaria la confirmación de que los mutantes dominantes inhibitorios presentan las mismas especificidades inhibitorias en estas localizaciones (Chiu et al 2002; Bivona y Philips 2003). Sin embargo, teniendo en cuenta que los mutantes dominantes inhibitorios localizan en los mismos microdominios de membrana que las proteínas salvajes, lo más probable es que también presenten el mismo patrón de localización en endomembranas que H-, K- y N-Ras. Por otro lado, se ha detectado la presencia de microdominios el aparato de Golgi por lo que las dos isoformas que aparecen localizadas en este orgánulo, H-Ras y N-Ras, deben de estar distribuidos como en la membrana plasmática, por lo que cabe esperar que los mutantes dominantes inhibitorios de estas isoformas presenten el mismo comportamiento que en la membrana plasmática. Nuestro modelo sí sirve para dar una explicación completa de lo que ocurre con el mutante K-N17, ya que K-Ras no aparece localizado en endomembranas y aunque se ha descrito su asociación a microtúbulos, no se ha demostrado que en esta localización sea funcional.

Una vez establecido el rango de especificidades de los mutantes dominantes inhibitorios de H-, K- y N-Ras, los hemos utilizado como reactivos para investigar la contribución relativa de sus correspondientes isoformas salvajes a las señales generadas por una serie de estímulos capaces de producir la activación de Ras, lo que también nos ha permitido comprobar la verosimilitud de nuestro modelo. Por un lado, estudiamos el efecto



de los mutantes dominantes inhibitorios de Ras sobre la señal debida a distintos estímulos mitogénicos que se unen a distintos receptores de membrana. El uso de estos mutantes podría ser también una herramienta importantísima para determinar en que compartimentos de la membrana plasmática estarían generándose estas señales.

Así, hemos comprobado que la señal de activación de ERK2 por EGF es inhibida por las tres isoformas, aunque de forma distinta: H-N17 inhibe casi totalmente el efecto de EGF, K-N17 ejerce una inhibición del 88%, y por último N-N17 inhibe un 55%. La inhibición llevada a cabo por H-N17 es el resultado de bloquear la señal generada por EGF en caveolas, lipid rafts y membrana desordenada, mientras que la ejercida por K-N17 es debida exclusivamente a la inhibición de la señal originada en membrana desordenada, por lo que estos resultados sugieren que K-Ras sería la isoforma de Ras utilizada preferentemente por EGF para activar la cascada de ERK.

Una situación similar se observa al inhibir la activación de ERK por PDGF, que es inhibida al mismo nivel por H-N17 y K-N17 pero mucho menos por N-N17, lo que esta en consonancia con resultados previos que apuntaban a que N-Ras no media eficientemente la activación debida a PDGF. (Wakelam et al 1986). La prevalencia del componente de la señal mediada por K-Ras en membrana desordenada es también importante en el caso de la activación de ERK2 estimulada por LPA, que es mas potentemente reprimida por K-N17.

De forma similar, hemos utilizado los mutantes dominantes inhibitorios de H., K y N-Ras para intentar determinar la especificidad que presentan distintos factores de intercambio de nucleótidos de la familia Ras a la hora de activar las distintas isoformas de las proteínas Ras.

De este modo hemos visto que la activación de ERK2 mediada por Ras GRF1 es completamente inhibida por H-N17 mientras que la expresión de K-N17 y de N-N17 no lo afectan en absoluto. Estos resultados indican que Ras-GRF1 sólo es capaz de activar a H-Ras, lo que está perfectamente de acuerdo con resultados previos que demostraban que *in vivo* Ras-GRF1 sólo induce intercambio de GDP/GTP en H-Ras, pero no en K-Ras ni N-Ras (Jones et al. 1998). Una situación similar es la que pudimos observar en el caso de Ras-GRF2, donde K-N17 y N-N17 sólo son capaces de disminuir ligeramente la activación de ERK2 debida a este factor de intercambio. Estos datos se pueden interpretar en el sentido de que Ras-GRF1 estaría activando a H-Ras exclusivamente en caveolas, mientras que Ras-GRF2 sería capaz de inducir, a un menor nivel, la activación de Ras en membrana desordenada y en lipid rafts. De hecho, hemos podido comprobar que Ras-GRF2 es capaz de inducir intercambio de GDP/GTP sobre N-Ras y K-Ras, aunque a un menor nivel que en el caso de H-Ras.



En el caso de CAL-DAG III, la capacidad de activar a ERK2 está significativamente afectada por la expresión de H-N17, mientras que la expresión de K-N17 y de N-N17 tiene un menor efecto inhibitorio. Esto pone de manifiesto que la porción de H-Ras localizado en caveolas es el principal mediador de este factor de intercambio de nucleótidos para activar a ERK2. En el caso de este factor de intercambio, hemos comprobado que el efecto que ejercen los mutantes dominantes inhibitorios de Ras sobre su función, se ajustan a las diferencias de afinidad que se habían descrito en ensayos de intercambio *in vivo*. De hecho, nuestros resultados ponen de manifiesto que CAL-DAG III activa principalmente a H-Ras, mientras que muestra una menor capacidad para inducir el intercambio de nucleótidos sobre K-Ras y N-Ras.

En el caso de SOS1 y GAL-DAGII, se da una situación especialmente llamativa, ya que en este caso, los tres mutantes N17 suprimen la activación de ERK2 con una eficiencia similar. En principio no esperábamos este resultado, ya que en función a nuestro modelo, si la señal generada en caveolas, lipid rafts y membrana desordenada fueran iguales, sería de esperar que H-N17 ejerciera una mayor inhibición que los otros dos mutantes dominantes inhibitorios. Aunque no tenemos una explicación precisa a este fenómeno, una posible explicación podría ser que los niveles de expresión de estos dos factores de intercambio serían tan altos que podrían revertir los efectos inhibitorios de los mutantes dominantes inhibitorios en todas las localizaciones. Una segunda posibilidad, sería que los mutantes N-17 podrían estar suprimiendo completamente la activación de ERK2 llevada a cabo por las tres isoformas de Ras y lo que estaríamos viendo es una activación residual de la ruta de ERK2 inducida por SOS1 y CAL-DAG II mediada por otra GTPasa. De hecho, tanto SOS1 como CAL-DAG II pueden estimular el intercambio de nucleótidos en M-Ras, y en el caso de CAL-DAG II también sobre TC21 (Ohba et al 2000). Una situación similar podría ocurrir en el caso de CAL-DAG I. Hemos demostrado que este factor de intercambio es incapaz de inducir el intercambio de nucleótidos en ninguna de las isoformas de Ras, lo que concuerda con los resultados de otros grupos (Clyde-Smith et al 2000). A pesar de esto, nuestros resultados muestran una potente activación de ERK2 inducida por CAL-DAG I, que además es insensible a la expresión de los mutantes inhibitorios H-N17, K-N17 y N-N17. Debido a que CAL-DAG I es un factor de intercambio efectivo de Rap-1 (Clyde-Smith et al 2000), es posible que este intercambiador esté activando ERK2 a través de la ruta Rap>B-Raf>MEK, de una forma independiente de Ras.

En resumen, nuestros resultados demuestran que, a pesar de que las tres isoformas de Ras comparten la mayor parte de los factores de intercambio, la especificidad de inhibición presentada por los mutantes dominantes inhibitorios H-N17, K-N17 y N-N17 es



significativamente distintas. De hecho, demostramos que las especificidades inhibitorias que presentan estos mutantes pueden ser razonablemente explicadas a la luz de los recientes descubrimiento sobre la compartimentalización de las proteínas Ras en distintos dominios de membrana. Esta situación puede tener un precedente en lo que ocurre en el caso de la familia de proteínas Rho. Se conoce que la mayor parte de los factores de intercambio de la familia Dbl son capaces de inducir intercambio de nucleótidos en Rho, Rac y Cdc42 (Whitehead et al 1997). A pesar de esto, el uso de los mutantes dominantes inhibitorios de Rho, Rac Y Cdc42 ha demostrado tener efectos extremadamente específicos. A la luz de nuestros resultados cabe pensar que esta especificidad pueda residir en gran medida, en la presencia de las proteínas Rho en distintas localizaciones de membrana. Como ocurre con los mutantes dominantes inhibitorios de la familia Rho, nuestros resultados abren la posibilidad de utilizar los mutantes dominantes inhibitorios H-N17, K-N17 y N-N17 como reactivos para futuros trabajos centrados en investigar las funciones de las proteínas Ras y las diferencias entre H-Ras, K-Ras y N-Ras

## **6. CONCLUSIONES**



## **6. CONCLUSIONES**

- 1. Los mutantes dominantes inhibitorios H-Ras N17, K-Ras N17 y N-Ras N17 presentan especificidades inhibitorias significativas:**
  - H-Ras N17 puede inhibir la activación de las tres isoformas de Ras.
  - K-Ras N17 inhibe completamente la activación de K-Ras y ligeramente la de H-Ras.
  - N-Ras N17 inhibe completamente la activación de N-Ras.
- 2. La isoforma N-Ras aparece localizada en dominios de membrana tipo lipid raft no caveolares.**
- 3. La especificidad inhibitoria de los mutantes sería debida a la localización en distintos subdominios de membrana.**

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



**7. BIBLIOGRAFÍA**

**Ajenjo N, Aaronson DS, Ceballos E, Richard C, Leon J, Crespo P.** (2000) Myeloid leukemia cell growth and differentiation are independent of mitogen-activated protein kinase ERK1/2 activation. *J Biol Chem*, **275**, 7189-7197.

**Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD.** Biología molecular de la Célula. Ediciones Omega, S.A. Tercera edición (1996).

**Apolloni A, Prior IA, Lindsay M, Parton RG, Hancock JF.** (2000). H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol*, **20**, 2475-2487.

**Arozarena I, Aaronson DS, Matallanas D, Sanz V, Ajenjo N, Tenbaum SP, Teramoto H, Ighishi T, Zabala JC, Gutkind JS, Crespo P.** (2000). The Rho family GTPase Cdc42 regulates the activation of Ras/MAP kinase by the exchange factor Ras-GRF. *J Biol Chem.*, **275**, 26441-26448.

**Arozarena I, Matallanas D, Crespo P.** (2001). Maintenance of CDC42 GDP-bound state by Rho-GDI inhibits MAP kinase activation by the exchange factor Ras-GRF. evidence for Ras-GRF function being inhibited by Cdc42-GDP but unaffected by CDC42-GTP. *J Biol Chem.* **276**, 21878-21884.

**Barbacid M.** (1987). Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 779-827

**Bar-Sagi D.** (2001). A Ras by any other name. *Mol Cell Biol.*, **21**, 1441-1443.

**Bivona TG, Philips MR.** (2003). Ras pathway signaling on endomembranes. *Curr. Op. Cell Biol.* **15**, 136-142

**Bollag G. and McCornick.** (1991) Differential regulation of Ras GAP and neurofibromatosis gene product activities. *Nature.* **351**, 576-579

**Bonfini L., Karlovich C.A., Dasgupta C., and Banerjee U.** (1992) The Son of Sevenless gene product: a putative activator of Ras. *Science.* **255**, 603-606

- Boriack-Sjodin PA, Margarit SM, Bar-Sagi D, Kuriyan J.** (1998). The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature*, **394**, 337-343.
- Bos JL.** (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **49**, 4682-4689.
- Bos JL.** (1998) A target for phosphoinositide 3-kinase: Akt/PKB. *Trends Biochem Sci.* **20**, 441-442
- Boussadia O.F., Aminot S., Cases G., Triquenaux H., Jacquemin-Sablon and Dautry F.** (1997) Transcription of *unr* down-regulates N-ras expression *in vivo*. *FEBS lett.* **420**, 20-24
- Bowtell D., Fu P., Simon M., and Senior P.** (1992) Identification of murine homologues of the Drosophila son of sevenless gene: potential activators of ras. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 6511-6515
- Boyartchuk VL, Ashby MN, Rine J.** (1997). Modulation of Ras and a-factor function by carboxyl-terminal proteolysis. *Science.* **275**, 1796-1800.
- Bradford M.** (1975). A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.*, **72**, 248-254
- Brown DA, and London E.** (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **14**, 111-136
- Brugger B, Sandhoff R, Wegehling S, Gorgas K, Malsam J, Helms JB, Lehmann Cadwallader KA, Paterson H, Macdonald SG, Hancock JF.** (1994). N-terminally myristoylated Ras proteins require palmitoylation or a polybasic domain for plasma membrane localization. *Mol Cell Biol.*, **14**, 4722-4730.
- Cantor SB, Urano T, Feig LA.** (1995) Ral binding protein 1, a potential downstream target of Ral GTPases. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 4578-4584
- Carozzi AJ, Roy S, Morrow IC, Pol A, Wyse B, Clyde-Smith J, Prior IA, Nixon SJ, Hancock JF, Parton RG.** (2002). Inhibition of lipid raft-dependent signaling by a dystrophy-associated mutant of caveolin-3. *J Biol Chem.* , **277**, 17944-17949.



**Casey PJ, Soliski PA, Der CJ, Buss JE.** (1989). p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**, 8323-8327.

**Clyde-Smith J, Silins G, Gartside M, Grimmond S, Etheridge M, Apolloni A, Hayward N, Hancock JF.** (2000). Characterization of RasGRP2, a plasma membrane-targeted, dual specificity Ras/Rap exchange factor. *J Biol Chem.*, **275**, 32260-32267.

**Coso O.A., Chiariello M., Yu J.C., Teramoto H., Crespo P., Xu N., Miki T., and Gutkind J.S.** (1995) Transforming G proteins-coupled receptors potently activate JNK (SAPK). *J Biol. Chem.* **270**, 5620-5642

**Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind JS.** (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell.*, **81**, 1137-1146.

**Crespo P, Leon J.** (2000) Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell Mol Life Sci.*, **57**(11), 1613-1636.

**Crespo P, Xu N, Simonds WF, Gutkind JS.** (1994). Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits.. *Nature*, **369**, 418-420

**Crews CM, Alessandrini MA and Erickson RL.** (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*. **257**, 418-420

**Crews CM, Erikson RL.** (1993) Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all. *Cell.*, **74**, 215-217.

**Chen Z, Otto JC, Bergo MO, Young SG, Casey PJ.** (2000). The C-terminal polylysine region and methylation of K-Ras are critical for the interaction between K-Ras and microtubules. *J. Biol. Chem.*, **275**, 41252-41257

**Cherfils J. and Chardin P.** (1999) GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 306-311

**Choy E, Chiu VK, Silletti J, Feoktistov M, Morimoto T, Michaelson D, Ivanov IE, Philips MR.** (1999). Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell*. **98**, 69-80.

**Dai Q, Choy E, Chiu V, Romano J, Slivka SR, Steitz SA, Michaelis S, Philips MR.** (1998). Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1998, **273**, 15030-15034.

**de Hoog C.L. Fan W.T., Goldstein M.D., Moran M.F., and Koch C.A.** (2000) Calmodulin-independent coordination of Ras and extracellular signal-regulated kinase activation by Ras-GRF2. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2727-2733

**Downward J.** (1998) Mechanisms and consequences of activation of protein Kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **20**, 262-267

**Ebinu J.O., Bottorf D.A., Chan E.Y., Stang S.L., Dunn R.J., and Stone J.C.** (1998) RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motif. *Science.* **280**, 1082-1086

**Esteban LM, Vicario-Abejon C, Fernandez-Salguero P, Fernandez-Medarde A, Fam N.P., Fan W.T., Wang Z., Zhang L.J., Chen H., and Moran M.F.** ( 1997) Cloning and characterization of Ras-GRF2, a novel guanine nucleotide exchange factor for Ras. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1396-1406

**Fam N.P., Zhang L.J., Rommens J.M. Beatty B.G., and Moran M.F.** (1997b) Mapping of the Ras GRF2 gene (GRF2) to mouse chromosome 13C3-D1 and human chromosome 5q13, bear the Ras GAP gene. *Genomics*, **39**, 118-120

**Fam NP, Fan WT, Wang Z, Zhang LJ, Chen H, Moran MF.** (1997). Cloning and characterization of Ras-GRF2, a novel guanine nucleotide exchange factor for Ras. *Mol Cell Biol*, **17**,1396-1406.

**Fan W.T., Koch C.A., de Hoog C.L., Fam N.P and Moran M.F.** (1998) the exchange factor Ras GRF2 activates Ras-dependent and Rac-dependet mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Biol.* **8**, 935-938

**Farnsworth C, Feig LA.** (1991) Dominant inhibitory mutations in the  $Mg^{2+}$  -binding site of H-Ras prevent its activation by GTP. *Mol Cell. Biol.* **11**, 4822-4829

**Farnworth CL, Marshall MS, Gibbs JB, Stacey DW, Feig LA.** (1991) Preferential inhibition of the oncogenic form of Ras H by mutations in the GAP Binding/effector domain. *Cell.* **64**, 625-633



**Feig LA, Cooper GM.** (1988). Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol Cell Biol.*, **8**, 3235-3243.

**Feig LA.** (1999). Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol.*, **1**, 25-27.

**Fiorucci G, Hall A.** (1988). All three human ras genes are expressed in a wide range of tissues. *Biochim Biophys Acta.*, **950**, 81-83.

**Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC.** (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 481-507

**Goi T, Rusanescu G, Urano T, Feig LA.** (1999) Ral-specific guanine nucleotide exchange factor activity opposes other Ras effectors in PC12 cells by inhibiting neurite outgrowth. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 1731-1741.

**Hancock JF, Cadwallader K, Marshall CJ.** (1991). Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras(B). *EMBO J.* **10**, 641-646.

**Hancock JF, Cadwallader K, Paterson H, Marshall CJ.** (1991). A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membranetargeting of ras proteins. *EMBO J.* **10**, 4033-4939.

**Hancock JF, Magee AI, Childs JE, Marshall CJ.** (1989). All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell.* **57**, 1167-1177.

**Hancock JF, Paterson H, Marshall CJ.** (1990). A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell.* **63**, 133-139.

**Hancock JF.** (2003) Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **4**, 373-84.

**Hofer FS, Fields S, Schneider C Martin GS.** (1994). Activated Ras interacts with the Ral guanine dissociation stimulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 11089-11093.

**Hooper NM.** (1999) Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich domains, lipid rafts and caveolae. *Mol. Membr. Biol.*, **16**, 145-156

**Hrycyna CA, Sapperstein SK, Clarke S, Michaelis S.** (1991) The *Saccharomyces cerevisiae* STE14 gene encodes a methyltransferase that mediates C-terminal methylation of a-factor and RAS proteins. *EMBO J.* **10**, 1699-1709.

**Ise K, Nakamura K, Nakao K, Shimizu S, Harada H, Ichise T, Miyoshi J, Gondo Jainchill J.L., Aaronson S.A., and Todero G.J.** (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol.* **4**, 549-553

**Jaumot M, Yan J, Clyde-Smith J, Sluimer J, Hancock JF.** (2002). The linker domain of the Ha-Ras hypervariable region regulates interactions with exchange factors, Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* , **277**(1):272-278..

**Jefers M, Pellicer A.** (1994). Identification of multiple promoters within the N-ras proto-oncogene. *Biochem Biophys Acta*, **1219**, 623-635

**Johnson L, Greenbaum D, Cichowski K, Mercer K, Murphy E, Schmitt E, Bronson Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, Tuveson DA, Jacks T.** (2001). Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature.*, **410**, 1111-1116.

**Jones M. K., Jackson J.H.** (1998) Ras-GRF activates Ha-Ras, but not N-Ras or K-Ras 4B, protein *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **273**, 1782-1787

**Jones S., Vignais M.L. Broach J.R.** (1991) The CDC25 protein of *Saccharomyces cerevisiae* promotes exchange of guanine nucleotides bound to Ras. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2941-2646

**Julien-Flores V, Dorseuil O, Romero F, Letourneur F, Saragosti S, Berger R et al.** (1996) Bridging Ral GTPases to Rho pathways. *J. Biol. Mol.*, **270**, 22473-22477

**Kamata T, Feramisco JR.** (1984). Epidermal growth factor stimulates guanine nucleotide binding activity and phosphorylation of ras oncogene proteins. *Nature.*, **310**, 147-150.



**Kawasaki H., Sprigett G.M., Toki S., Canales J.J., Harlan P., Blumenstiel J.P., Chen E.J., Bany I.A., Mochizuki N., Ashbacher A., Matsuda M., Housman D.E., and Graybiel A.M.** (1998) A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95** 13278-13283

**Kelley GG, Reks SE, Ondrako JM, Smrcka AV.** (2001) Phospholipase C $\epsilon$ : a novel Ras effector. *EMBO J.*, **20**, 743-754

**Kikuchi A, Demo SD, Ye ZH, Chen W, Williams LT.** (1994) ral GDS family members interact with the effector loop of p21 ras. *Mol. Cell Biol.*, **14**, 7483-7491.

**Koera K, Nakamura K, Nakao K, Miyoshi J, Toyoshima K, Hatta T, Otani H, Aiba A, Katsuki M.** (1997). K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene.* , **15**,1151-1159

**Kranenburg O, Verlaan I, Moolenaar WH.** (2001). Regulating c-Ras function. cholesterol depletion affects caveolin association, GTP loading, and signaling. *Curr Biol.*, **11**, 880-884.

**Lai C.C., Boguski M., Broek D. And Powers S.** (1993) Influence of guanine nucleotides on complex formation between Ras and CDC25 proteins. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1345-1352

**Lenzen C, Cool RH, Prinz H, Kuhlmann J, Wittinghofer A.** (1998). Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25Mm. *Biochemistry.* **37**, 7420-7430

**Leon J, Guerrero I, Pellicer A.** (1987). Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol Cell Biol.*, **7**, 1535-1540.

**Levis GM, Evangelatos GP, Crumpton MJ.** (1976) Lipid composition of lymphocyte plasma membrane from pig mesenteric lymph node. *Biochem J.*, **156**, 103-110.

**Liu P, Ying Y, Anderson RG.** (1997). Platelet-derived growth factor activates mitogen-activated protein kinase in isolated caveolae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**,13666-13670.

**Liu P, Ying Y, Ko YG, Anderson RG.** (1996). Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *J Biol Chem*, **271**, 10299-10303.

- Lowy DR, Willumsen BM.**(1993). Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem.*,**62**, 851-891.
- Luo JQ, Liu X, Frankel P, Rotunda T, Ramos M, Flom J et al.** (1998) Functional association between Arf and Ral in active phospholipase D complex. *Proc. Natl Acad Sci. USA.* **95**, 3632-3637
- Ma J, Karplus M.** (1997). Molecular switch in signal transduction: reaction paths of the conformational changes in ras p21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**, 11905-11910.
- Madin S.H., and Darby N.B.** (1958). University of California, School of Public Health, Naval Biological Laboratory, Berkeley, CA.
- Magee A.I., Gutierrez L., Mckay I.A., Marshall C.J., and Hall A.** (1987). Dynamic fatty acid acylation of N-Ras. *EMBO J.* **6**, 3353-3357
- Magee T, Marshall C.** (1999) New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane. *Cell.* **98**, 9-12
- Maher J., Baker D., Manning M., Dibb N.J., Roberts IAG.** (1995) Evidence for cell-specific differences in transformation by N-, H- and K-Ras. *Oncogene.* **11**, 1639-1647
- Malumbres M, Pellicer A.** (1998). RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci.* **3**, 887-912.
- Maxfield FR.** (2002). Plasma membrane microdomains. *Curr. Op. Cell Biol.* **14**, 483-487
- Melkonian KA, Ostermeyer AG, Chen JC, Roth MG, Brown DA.** (1999). Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent resistant membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **274**, 3910-3917
- Mineo C, James GL, Smart EJ, Anderson RG.** (1996). Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. *J Biol Chem.* **271**, 11930-11935.
- Mizuno T, Kaibuchi K, Yamamoto T, Kawamura M, Sakoda T, Fujioka H, Matsuura Y and Takai Y.** (1991). A stimulatory GDP/GTP exchange protein for smg p21 is activate on the post-translationally processed form of c-Ki Ras p21 and Rho A p21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 6442-446



- Moffett S, Brown DA, Linder ME.** (2000). Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J. Biol. Chem.*, **275**, 2191-2198
- Morrow IC, Rea S, Martin S, Prior IA, Prohaska R, Hancock JF, James DE, Parton RG.** (2003). Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. *J Biol Chem.*, **277**, 48834-48841..
- Muller R, Slamon DJ, Adamson ED, Tremblay JM, Muller D, Cline MJ, Verma IM.** (1983). Transcription of c-onc genes c-rasKi and c-fms during mouse development. *Mol Cell Biol.*, **3**, 1062-1069.
- Ohba Y., Mochizuki N., Yamashita S., Chan A.M., Schrader J.Wt., Hattori S., Nagashima K., and Matsuda M.** (2000) Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J. Biol. Chem.* **275**, 20020-20026
- Otto JC, Kim E, Young SG, Casey PJ.** (1999). Cloning and characterization of a mammalian prenyl protein-specific protease. *J Biol Chem.* **274**, 8379-8382
- Paciucci R, Pellicer A.** (1991). Dissection of the mouse *N-ras* gene upstream regulatory sequences, overlapping with an adjacent gene. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1334-1343.
- Parton RG, Hancock JF.** (2001). Caveolin and Ras function. *Methods Enzymol.*, **333**, 172-183.
- Pierce K.L., Luttrell L.M and Lefkowitz R.J.** (2001) New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene.* **20**, 1532-1539
- Porfiri E, Evans T, Chardin P, Hancock JF.** (1994). Prenylation of Ras proteins is required for efficient hSOS1-promoted guanine nucleotide exchange. *J Biol Chem.* , **269**, 22672-22677.
- Prior IA, Hancock JF.** (2001). Compartmentalization of Ras proteins. *J Cell Sci.* **114**, 1603-1608.

- Prior IA, Muncke C, Parton RG, Hancock JF.** (2003). Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol.*, **160**, 165-170.
- Prior IA, Parton RG, Hancock JF.** (2003). Observing cell surface signaling domains using electron microscopy. *Sci STKE*. ;**2003**(177):PL9.
- Quilliam L.A., Khosravi-Far R., Huff S.Y., and Der J.C.** (1995) Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *Bioassays*. **17**, 395-404
- Quincoces A F, Leon J.** (1995). Serum growth factors upregulate H-ras, K-ras, and N-ras proto-oncogenes in fibroblast. *Cell Growth Differ.*, **6**, 271-279.
- Quincoces A F, Polanco I, Thomson T, Leon J.** (1997). Positive autoregulation of ras genes expression in fibroblasts. *FEBS Lett.*, **416**, 317-323
- Rebollo A, Perez-Sala D, Martinez-A C.** (1999). Bcl-2 differentially targets K-, N-, and H-Ras to mitochondria in IL-2 supplemented or deprived cells: implications in prevention of apoptosis. *Oncogene*. **18**, 4930-4939.
- Renkonen O, Kaarainen L, Simons K, Gahmberg CG.** (1971) The lipid class composition of Semliki forest virus and plasma membranes of the host cells. *Virology*. **46**, 318-326
- Rietveld A, Neutz S, Simons K, Eaton S** (1999) Association of sterol and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with *drosophila* rafts lipid microdomains. *J. Biol. Chem.*, **274**, 12049-12054
- Rodenhuis S.** (1992). ras and human tumors. *Semi. Cancer Biol.* **3**, 241-247
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J.** (1994) phosphatidylinositol 3-kinase as a direct target for Ras. *Nature*. **370**, 527-532
- Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E, Rolls B, Hancock JF, Parton RG.** (1999). Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol.* **1**, 98-105.



- Roy S, Wyse B, Hancock JF.** (2002). H-Ras signaling and K-Ras signaling are differentially dependent on endocytosis. *Mol Cell Biol.*, **22**, 5128-5140.
- RT, Umanoff H, Edelmann W, Kucherlapati R, Jacks T.** (1997). K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev.*, **11**, 2468-2481
- Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edition). *Nolan C ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA)*
- Schroeder H., Leventis R., Rex S., Schelhaas M., Nagele E., Waldmann H., Silvius J.R.** (1997) S-Acylation and plasma membrane targeting of the farnesylated carboxi-terminal peptide of N-Ras In mammalian fibroblast. *Biochemistry.* **36**, 13102-13109
- Schroeder R, London E, Brown D.** (1994). Interactions between saturated acyl chains and GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 12130-12134
- Sigal IS, Gibbs JB, D'Alonzo JS, Temeles GL, Wolanski BS, Socher SH, Scolnick EM.** (1986). Mutant ras-encoded proteins with altered nucleotide binding exert dominantbiological effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **83**, 952-956.
- Simons K, Ikonen E** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature.* **387**, 569-572
- Simons K, Toomre D.** (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Moll. Cell Biol.* **1**, 31-38
- Simons K, van Meer G.** (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry.* **27**, 6197-6202
- Singer SJ, Nicholson GL.** (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* **175**, 720-731
- Stacey DW, Feig LA, Gibbs JB.** (1991). Dominant inhibitory Ras mutants selectively inhibit the activity of either cellular or oncogenic Ras. *Mol Cell Biol.*, **11**, 4053-4064.

- Sturani E., Abbondio A., Branduardi P., Ferrari C., Zippel R., Martegani E., Vanoni M., and Denis Donini S.** (1997) The Ras guanine exchange factor CDC25Mm is present at the synaptic junction. *Exp. Cell. Res.* **235**, 117-123
- Swaminathan N, Yienger K, Lopez E, Malumbres M, McKay R, Ward JM, Pellicer A, Santos E.** (2001). Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol Cell Biol.*, **21**, 1444-1452.
- Taylor SJ, Shalloway D.** (1996). Cell cycle-dependent activation of Ras. *Curr Biol.*, **6**, 1621-1627.
- Thissen JA, Gross JM, Subramanian K, Meyer T, Casey PJ.** (1997) Prenylation-dependent association of K-ras with microtubules. Evidences for a role in subcellular trafficking. *J. Biol. Chem.* **272** , 30362-30370
- Thomas WG, Parton RG, Hancock JF.** (2003). Caveolin interacts with the angiotensin II type 1 receptor during exocytic transport but not at the plasma membrane. *J Biol Chem.*, **278**, 23738-46
- Tognon C.E., Kirk H.E., Passmore L.A., Whithead I.P., Der C.J., and Kay R.J.** (1998) Regulation of RasGRP via a phorbol ester responsive C1 domain. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6995-7008
- Treisman R.** (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin Cell. Biol.*, **8**, 205-216.
- Ulsh L, Shih TY.** (1984). Metabolic turnover of human c-ras-H p21 protein of EJ bladder carcinoma and its normal cellular and viral homologs. *Mol Cell Biol.* **4**, 1647-1652.
- Umanoff H, Edelmann W, Pellicer A, Kucherlapati R.** (1995). The murine N-ras gene is not essential for growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **92**, 1709-1713
- Urano T, Emkey R, Feig LA.** (1996) Ral GTPase mediate a distinct pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *EMBO J.*, **15**, 810-816
- van Meer G,** (1989) Lipid traffic in animal cells. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **5**, 247-275



- Voice JK, Klemke RL, Le A, Jackson JH.** (1999). Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J Biol Chem*, **274**, 17164-17170.
- Wakelam MJ, Davies SA, Houslay MD, McKay I, Marshall CJ, Hall A.** (1986). Normal p21N-ras couples bombesin and other growth factor receptors to inositol phosphate production. *Nature*, **323**, 173-176
- Walsh AB, Bar-Sagi D.** (2001). Differential activation of the Rac pathway by Ha-Ras and K-Ras. *J Biol Chem.*, **276**, 15609-15615
- WD, Nickel W, Wieland FT.** (2000) Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during formation of COPI-coated vesicles. *J Cell Biol.*; **151**, 507-518
- Welman A, Burger MM, Hagmann J.** (2001). Structure and function of the C-terminal hypervariable region of K-Ras4B in plasma membrane targeting and transformation. *Oncogene*, **19**, 4582-4591
- White MA, Vale T, Camonis JH, Schaefer E Wigler MH.** (1996) A role for the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator in mediating Ras-induced transformation. *J. Biol. Chem.*, **271**, 16422-16439.
- Whitehead IP, Campbell S, Rossman KL, Der CJ.** (1997). Dbl family proteins. *Biochim Biophys Acta.*, **1332** 1-23
- Willumsen BM, Christensen A, Hubbert NL, Papageorge AG, Lowy DR.** (1984). The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature*, **310**, 583-6.
- Wolfman A.** (2001) Ras isoform-specific signaling: location, location, location. *Science STKE*. **96**, pe2
- Wolfman JC, Palmby T, Der CJ, Wolfman A.** (2002) Cellular N-Ras promotes cell survival by downregulation of Jun N-terminal protein kinase and p38. *Mol Cell Biol.* **22**.1589-1606
- Wolfman JC, Wolfman A.** (2000). Endogenous c-N-Ras provides a steady-state anti-apoptotic signal. *J Biol Chem*, **275**, 19315-19323.

**Y, Ishikawa T, Aiba A, Katsuki M.**(2000). Targeted deletion of the H-ras gene decreases tumor formation in mouse skin carcinogenesis. *Oncogene*. **19**, 2951-2956.

**Yan J, Roy S, Apolloni A, Lane A, Hancock JF.** (1998). Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide3-kinase. *J Biol Chem*. **273**, 24052-24056.



## **8. ANEXO PUBLICACIONES**

## Differences on the Inhibitory Specificities of H-Ras, K-Ras, and N-Ras (N17) Dominant Negative Mutants Are Related to Their Membrane Microlocalization\*

Received for publication, September 24, 2002, and in revised form, November 19, 2002  
Published, JBC Papers in Press, November 27, 2002. DOI 10.1074/jbc.M209807200

David Matallanas<sup>‡</sup>, Imanol Arozarena<sup>‡§¶</sup>, María T. Berciano<sup>||</sup>, David S. Aaronson<sup>§\*\*</sup>,  
Angel Pellicer<sup>‡‡§§</sup>, Miguel Lafarga<sup>||</sup>, and Piero Crespo<sup>‡¶¶</sup>

From the <sup>§</sup>Departamentos de Biología Molecular and <sup>||</sup>Anatomía y Biología Celular, Universidad de Cantabria, Santander 39011, Spain, the <sup>‡‡</sup>Department of Pathology and Kaplan Comprehensive Cancer Center, New York University School of Medicine, New York, New York 10016, and the <sup>‡</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Arturo Duperier 4, Madrid 28029, Spain

Ras GTPases include the isoforms H-Ras, K-Ras, and N-Ras. Despite their great biochemical and biological similarities, evidence is mounting suggesting that Ras proteins may not be functionally redundant. A widespread strategy for studying small GTPases is the utilization of dominant inhibitory mutants that specifically block the activation of their respective wild-type proteins. As such, H-Ras N17 has proved to be extremely valuable as a tool to probe Ras functions. However, a comparative study on the inhibitory specificities of H-, K-, and N-Ras N17 mutants has not been approached thus far. Herein, we demonstrate that H-, K-, and N-Ras N17 mutants exhibit markedly distinct inhibitory effects toward H-, K-, and N-Ras. H-Ras N17 can effectively inhibit the activation of all three isoforms. K-Ras N17 completely blocks the activation of K-Ras and is only slightly inhibitory on H-Ras. N-Ras N17 can mainly inhibit N-Ras activation. In light of the recent data on the compartmentalization of H-Ras and K-Ras in the plasma membrane, here we present for the first time a description of N-Ras cellular microlocalization. Overall, our results on Ras N17 mutants specificities exhibit a marked correlation with the localization of the Ras isoforms to distinct membrane microdomains.

Ras GTPases are essential mediators in signaling pathways that convey extracellular signals from surface receptors to the interior of the cell, functioning as molecular switches in processes governing cell proliferation, survival, and differentiation (1, 2). The three mammalian *ras* genes encode for four proteins: H-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B, and N-Ras, of 189 amino acids (188 in K-Ras4B) and 21 kDa. These proteins are identical over the N-terminal 85 residues, and their identity is up to 90% within the following 80 residues. The main divergence among Ras isoforms is restricted to the 24 C-terminal amino acids, in

which less than 15% of the residues are identical between any pair of proteins, with the sole exception of cysteine 186. For this reason, this segment has been termed the heterogeneous or hypervariable region (3). This region contains an essential signal for localizing Ras to the inner surface of the plasma membrane, the CAAX box (C = cysteine, A = aliphatic amino acid, and X = serine/methionine), located at the extreme C terminus. The CAAX box suffers a post-translational modification that makes it more hydrophobic. The cysteine is farnesylated, the AAX sequence is proteolyzed, and the newly C-terminal cysteine is carboxymethylated (4). A second signal is required for efficiently positioning Ras in the membrane. This is accomplished by palmitoylation of cysteine 181 in N-Ras and cysteines 181 and 184 in H-Ras. In the case of K-Ras4B the second signal consist of a polybasic motif of six lysines (175–180) that is believed to interact electrostatically with the negatively charged membrane (5–7).

In mammals, the three *ras* genes are ubiquitously expressed, even though the expression pattern for each gene is quantitatively different depending on the organ (8, 9). Variations in the expression pattern also exist throughout embryonic development (8, 10) and during differentiation processes (2). But despite these differences, no instance has been reported in which the expression of any one of the three *ras* genes is completely absent. This has led to the notion that, regardless of their great similarities, the functions of the three Ras proteins may not be completely redundant. In this line, during these past years a considerable amount of data has been accumulated that speaks in favor of the three Ras proteins having differential functions. As such, different *ras* genes are activated in different human tumors (11, 12). Likewise, the three *ras* genes have different transforming potential depending on the cell line (13), suggestive of cell-specific activities. Ras proteins exhibit distinct sensitivities to inhibition by GAPs (14) and to activation by guanine-nucleotide exchange factors (GEFs) (15, 16). Also, regarding effector interactions, Ras isoforms vary in their ability to activate Raf, phosphoinositide 3-kinase, and Rac-1 (17–19). But perhaps the most compelling evidence advocating for the three Ras proteins having distinct functions

\* This work was supported by Grant PM 98-0131 from the Spanish Ministry of Education and Grant 01-087 from the Association for International Cancer Research. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ Predoctoral fellow of the Spanish Ministry of Education.

\*\* Present address: Mount Sinai School of Medicine, One Gustave L. Levi Place, New York, NY 10029-6574.

§§ Supported by National Institutes of Health Grant CA-36327.

¶¶ To whom correspondence should be addressed: Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Arturo Duperier 4, Madrid, 28029, Spain. Tel.: 34-91-5854886; Fax: 34-91-5854587; E-mail: pcrespo@iib.uam.es.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: GEF, guanine-nucleotide exchange factor; HA, hemagglutinin; MDCK, Madin-Darby canine kidney; MEF, mouse embryo fibroblast; EGF, epidermal growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor; LPA, lysophosphatidic acid; ERK, extracellular signal-regulated kinase; MBP, myelin basic protein; PBS, phosphate-buffered saline; MEK, mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase; GST, glutathione S-transferase; GFP, green fluorescent protein.



has been provided by gene targeting experiments. It has been found that N-ras knock-out mice develop and reproduce normally (20). H-ras knock-out animals are also normal (21). Strikingly, H- and N-ras double knock-outs also exhibit no detectable abnormalities (22). On the other hand, K-ras-deficient mice die during embryonic development (23, 24), suggesting that K-Ras possesses functions not shared by H- or N-Ras.

Recently, a considerable body of evidence has been accumulated suggesting that the aforementioned biochemical and biological differences among Ras isoforms could be due, in part, to variations in plasma membrane microlocalization (25). In this line, it has been shown that H-Ras is equally localized in caveolae, lipid rafts, and disordered membrane. By contrast, K-Ras is preferentially located in disordered, nonraft plasma membrane (26), although some may be present in caveolae depending on the cell type (27). Likewise, N-Ras localizes to caveolin-positive and caveolin-negative domains (27), but its detailed microlocalization has not been examined so far. Recent reports also demonstrate that all of the information required for membrane localization is contained in the hypervariable regions of the Ras isoforms (28, 29) that also dictate how Ras proteins traffic to their final locations. Whereas H- and N-Ras traffic to the plasma membrane along the secretory pathway through the Golgi complex, K-Ras4B is directly routed from the endoplasmic reticulum to the membrane by still unknown mechanisms (30, 31).

Multiple strategies have been utilized thus far to unveil the functions of Ras proteins in cells. Among these, the use of dominant inhibitory mutants is now widely established (32). Ever since its identification (33, 34) the Ras mutant with a substitution of serine 17 by asparagine (Ras N17) and its homologues have been invaluable tools in the extensive progress that has been made in our understanding of the roles of Ras-related GTPases in general and of Ras in particular. It is now accepted that Ras N17 mutants work *in vivo* by competing with wild-type Ras for binding to exchange factors. Because N17 mutants have a higher affinity for exchange factors than does normal Ras, and they cannot interact with downstream effectors, this results in the formation of unproductive complexes, thereby preventing the activation of endogenous Ras (32). As such, it could be concluded that rather than inhibiting Ras itself, N17 mutants inhibit the function of exchange factors. Consistently, because most Ras exchange factors can activate H-, K-, and N-Ras, at least *in vitro* (35), the expression of one Ras N17 mutant could be predicted to block the activation of the other two Ras isoforms. This conceptual pitfall may have precluded a more extensive use of the N17 mutants for the study of the differential functions of the three Ras isoforms. However, a comparative study on the specificities of H-, K-, and N-Ras dominant inhibitory mutants has not been approached experimentally so far.

Herein, we have undertaken that challenge. We demonstrate that H-, K-, and N-Ras N17 mutants exhibit markedly distinct specificities on their inhibitory functions. H-Ras N17 can inhibit the activation of all three isoforms. K-Ras N17 completely inhibits the activation of K-Ras and, slightly, that of H-Ras. Likewise, N-Ras N17 can chiefly inhibit N-Ras activation. These results can be explained in light of the recent data on the compartmentalization of Ras proteins. In this respect, we present for the first time a detailed description of N-Ras cellular microlocalization.

#### MATERIALS AND METHODS

**Constructs**—Plasmids encoding for CAL-DAG I and III were provided by M. Matsuda; Ras-GRP (CAL-DAG II) was provided by J.C. Stone; Ras-GRF2 was provided by M.F. Moran. K-Ras4B N17, N-Ras N17, and H-Ras  $\Delta$ CAAX (lacking Cys<sup>160</sup>) and N-Ras S186C were generated by PCR-directed mutagenesis and verified by sequencing.

Sequences of the oligonucleotides utilized are available upon request. The inserts were cloned in pCEFL, a modified pCDNA3 in which the cytomegalovirus promoter was substituted for the EF-1 $\alpha$  promoter, containing an N-terminal hemagglutinin (HA), a FLAG or an AU5 tag, or a Src myristoylation signal, as indicated. H-Ras, N-Ras, and N-Ras C-terminal 26 amino acids (hypervariable region) were cloned in pEGFP-C1.

**Cell Culture**—COS-7, NIH3T3, and MDCK cells were regularly grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum (new born, for NIH3T3). COS-7 subconfluent cells were transfected by the DEAE-dextran technique (36). MEFs were regularly grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum, L-glutamine 2 mM, 0.1 mM minimum essential medium nonessential amino acids,  $\beta$ -mercaptoethanol 55  $\mu$ M. MEFs, NIH3T3, and MDCK cells were transfected with LipofectAMINE (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. EGF and PDGF were from Upstate Biotechnology, Inc. LPA was from Sigma.

**Kinase Assays**—ERK2 kinase activities were determined as previously described (37), in anti-HA immunoprecipitates using myelin basic protein (MBP) as substrate (Sigma).

**Immunoblotting**—Total lysates and immunoprecipitates were fractionated in SDS-PAGE gels and transferred onto nitrocellulose filters as described (38). Immunocomplexes were visualized by ECL detection (Amersham Biosciences) using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Cappel). Mouse monoclonal antibodies anti-AU5 and anti-HA antibodies were from Babco. Mouse monoclonal anti-FLAG was from Invitrogen. Mouse monoclonal antibodies anti-H-Ras, -K-Ras, -N-Ras, and -caveolin were from Santa Cruz Laboratories. Mouse monoclonal anti-Pan-Ras was from Calbiochem.

**Ras GTP Loading**—Ras GTP loading was performed basically as described (39). Briefly, HA-Ras-transfected cells were lysed in HEM buffer (25 mM HEPES, pH 7.3, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 0.5 mM EGTA, 20 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 0.5% Nonidet-P40, 4% glycerol, 2 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25  $\mu$ g/ml leupeptin, and 25  $\mu$ g/ml aprotinin). HA-Ras was affinity sequestered with bacterially synthesized GST-Raf Ras-binding domain (amino acids 1-149). Immunoblots were performed as described above using anti-HA antibody and quantitated by densitometry, using the program NIH Image 1.60. Ras-GTP levels were related to total Ras protein levels as determined by anti-HA immunoblotting in the corresponding total lysates.

**Subcellular Fractionation**—Subcellular fractionation was performed in 20 mM HEPES pH 7.4 buffer, basically as described (37).

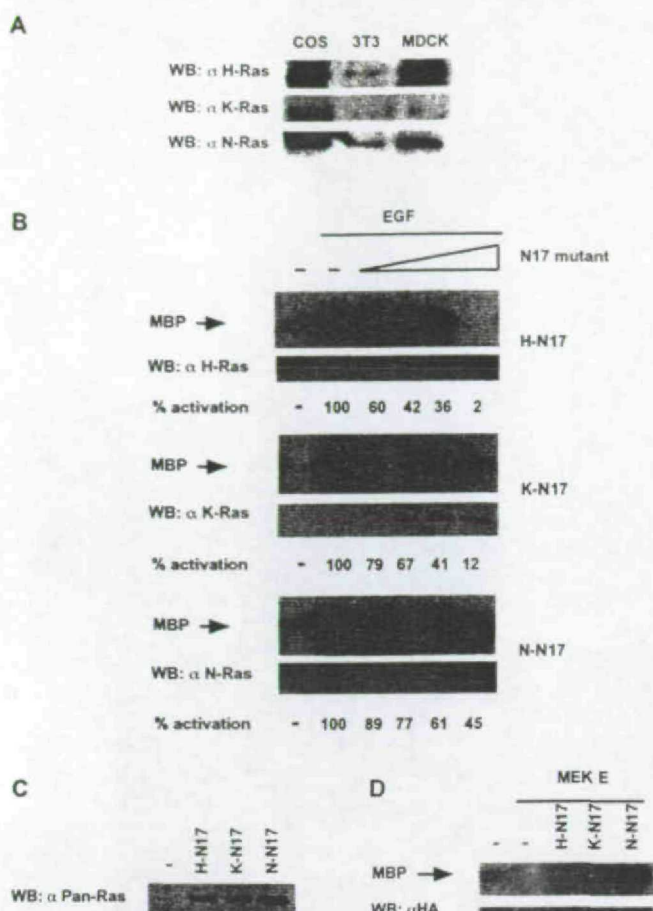
**Sucrose Gradients**—The cells were collected and resuspended in 25 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 0.25% Triton X-100, rocking at 4 °C for 1 h. The lysates were set to a sucrose concentration of 41%. Layers of 8.5 ml of 35% sucrose (in 10 mM Tris, pH 7.4) and of 2.5 ml 16% sucrose were sequentially overlaid and centrifuged in a Beckman SW41 rotor for 18 h at 35000 rpm. Eleven or twelve 1-ml fractions were collected, precipitated in 6.5% trichloroacetic acid, resuspended in loading buffer, and fractionated in 12% SDS-PAGE gels.

**Immunoelectron Microscopy**—MDCK cells transfected with vector, GFP-H-Ras, GFP-N-Ras, and GFP-N-Ras-hypervariable region were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 1 h at room temperature. The cells were scraped, transferred to an Eppendorf tube, and centrifuged for 10 min. The pellets were washed with 0.1 M phosphate buffer, dehydrated in increasing concentrations of methanol at -20 °C, embedded in Lowicryl K4M at -20 °C, and polymerized with ultraviolet irradiation. Ultrathin sections were mounted on nickel grids and sequentially incubated with 0.1 M glycine in PBS for 15 min, with 5% bovine serum albumin in PBS for 1 h, and finally with the monoclonal anti-GFP antibodies (clones 7.1 and 13.1; Roche Molecular Biochemicals) for 1 h (diluted 1:100 in PBS, 1% bovine serum albumin, 0.1 M glycine). After washing, the sections were incubated with goat anti-mouse IgG coupled to 10-nm gold particles (BioCell; diluted 1:50 in PBS, 1% bovine serum albumin). After immunogold labeling, the ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a Philips EM208 electron microscope operated at 60 kV. As controls, ultrathin sections were treated as described above but omitting the primary antibody.

#### RESULTS

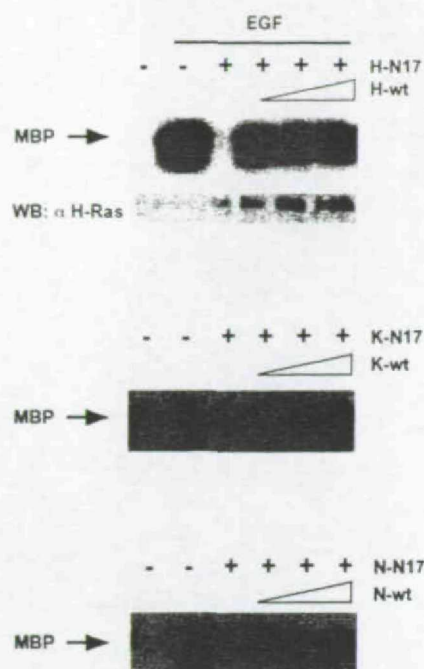
To avoid misinterpretations, an initial requisite in this project was to verify that the Ras isoforms under study were expressed in those cell lines to be utilized. Using antibodies that specifically recognize H-Ras, K-Ras, and N-Ras, we ascertained that these proteins were detectable in lysates from





**FIG. 1.** A, endogenous levels of H-Ras, K-Ras, and N-Ras in COS-7, NIH3T3, and MDCK cells. Cells from confluent 100-mm plates were collected in PBS, and pellets were lysed in 250  $\mu$ l of lysis buffer. The proteins were fractionated by PAGE, and Western blots (WB) were performed using antibodies that specifically recognize the three Ras isoforms. B, concentration-dependent inhibition of the activation of ERK2 by Ras dominant inhibitory mutants. Kinase assays were performed using MBP as substrate, in anti-HA immunoprecipitates from COS-7 cells co-transfected with HA-ERK2 (1  $\mu$ g) and with vector (-) or with increasing concentrations (50, 100, 200, and 250 ng) of constructs encoding H-N17, K-N17, and N-N17 as indicated, and stimulated with EGF (100 ng/ml) for 5 min after 12 h of serum starvation. Lower panels, protein levels of H-N17, K-N17, and N-N17 as determined by immunoblotting using isoform-specific antibodies. The panels show the average activation relative to EGF-treated cells from three independent experiments. C, expression levels of H-N17, K-N17, and N-N17 in total cellular lysates, resulting from transfection of 250 ng of their respective coding constructs, as determined by anti-Pan-Ras immunoblotting. D, effects of Ras dominant inhibitory mutants on the activation of ERK2 induced by MEK1. Kinase assays were performed in anti-HA immunoprecipitates from COS-7 cells transfected with HA-ERK2 (1  $\mu$ g) in addition to MEK1 EE (1  $\mu$ g) and plasmids encoding for H-N17, K-N17, and N-N17 (250 ng). Lower panel, protein levels of HA-ERK2 as determined by immunoblotting using an HA-specific antibody.

COS-7, NIH3T3, and MDCK cells (Fig. 1A), thereby validating these three cell lines for further experimentation. As a first approach to investigate the specificity of H-, K-, and N-Ras N17 mutants (referred to as H-N17, K-N17, and N-N17 hereafter), we compared the inhibitory potential that each of the Ras dominant interfering mutants displayed against a Ras-activating stimulus such as EGF (40). As a readout, we utilized the activation of ERK2, whose activation by EGF in COS-7 cells has been previously shown to be potently inhibited by the original H-N17 (41). For this purpose, COS-7 cells were transiently transfected with HA-ERK2 and with increasing concentrations of the three inhibitory mutants. Upon stimulation with EGF it was found that H-, K-, and N-N17 were capable of



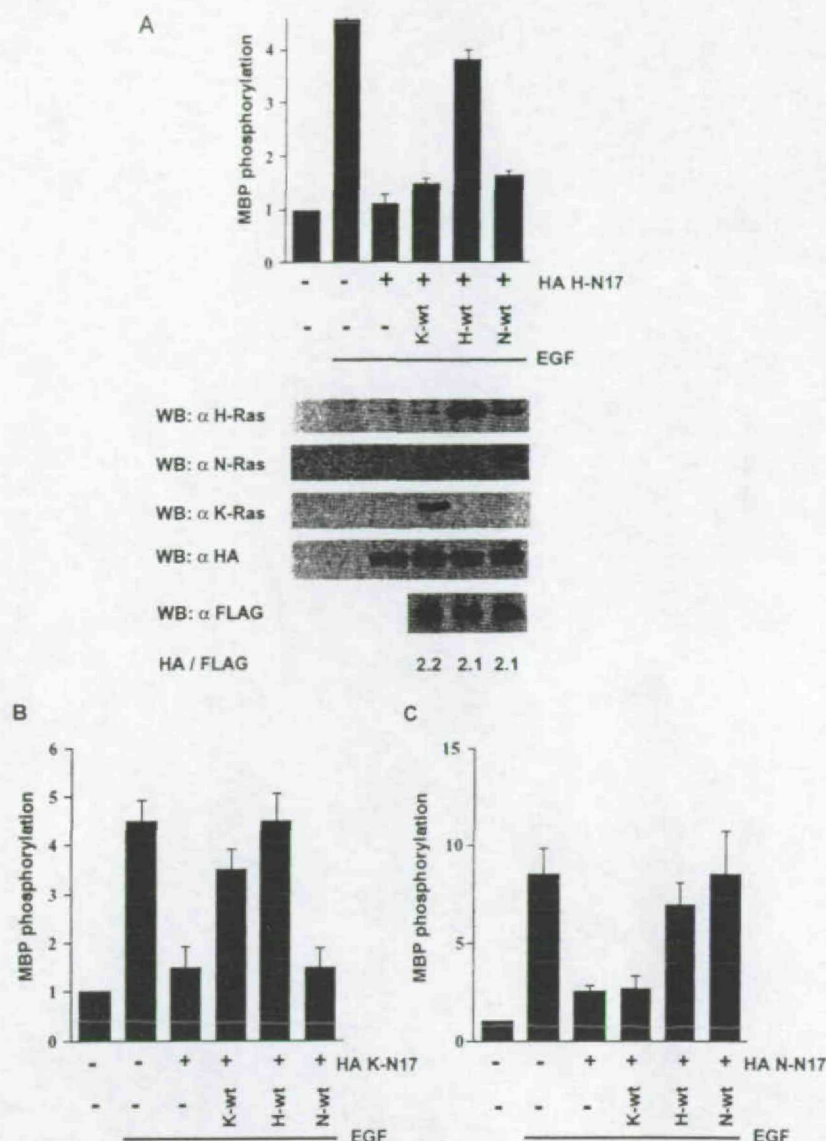
**FIG. 2.** Inhibition by H-, K-, and N-Ras N17 mutants is rescued by the overexpression of their respective wild-type proteins. COS-7 cells were co-transfected with AU5-ERK2 (1  $\mu$ g), with vector (-) or with 250 ng of constructs for H-N17, K-N17, and N-N17 (+) as indicated in the different panels, in addition to increasing concentrations (500 ng, 750 ng, and 1  $\mu$ g) of plasmids encoding H-, K-, or N-Ras wild types (wt). Upon stimulation with EGF (100 ng/ml) for 5 min, after 12 h of serum starvation, the kinase assays were performed in anti-AU5 immunoprecipitates, using MBP as substrate, as described under "Materials and Methods." Lower panel, protein levels of H-Ras as determined by immunoblotting using an H-Ras-specific antibody. WB, Western blot.

diminishing EGF-induced activation of ERK2, although to different extents. At the maximum expression levels, H-N17 caused a total repression on ERK2 activation, K-N17 inhibited EGF-induced ERK2 activity by 88%, and N-N17 exhibited the least inhibitory effect, only reaching a 55% inhibition (Fig. 1B). We also monitored the protein levels of the three N17 mutants using antibodies specific for H-, K-, and N-Ras, verifying that, in all three cases, the augmentation in their inhibitory effects correlated with an increase in their protein levels (Fig. 1B, bottom panels). Because intrinsic variations in the affinity of the Ras isoform-specific antibodies precluded a comparison of the isoforms protein levels, we also utilized a pan-Ras antibody that recognizes equally the three Ras isoforms to ascertain that variations in the inhibitory potential of the N17 mutants were not due to differences in their expression. As shown in Fig. 1C, the protein levels of the three N17 mutants, resulting from the transfection of 250 ng of their coding constructs, were similar. To make sure that the inhibitory effects of the Ras N17 mutants were not due to some unspecific, Ras-independent process, we co-transfected a constitutively active mutant of MEK1 (MEKE), known to act downstream from Ras (36), with H-N17, K-N17 and N-N17 mutants. It was found that the activation of ERK2 by MEKE was completely unaffected by the Ras inhibitory mutants (Fig. 1D), thus verifying that the inhibitory effects of H-, K-, and N-Ras dominant interfering mutants were Ras-mediated.

It is well known that the inhibitory effects of Ras N17 can be overcome by the increased expression of wild-type Ras (34, 42). Therefore, we tested whether the inhibition of EGF-induced activation of ERK2 by H-, K-, and N-Ras inhibitory mutants could be rescued by an overexpression of their respective wild-type proteins. As such, the cells were transfected with H-N17,



**FIG. 3. Specific rescue by Ras isoforms of the inhibition induced by H-, K-, and N-Ras N17 mutants.** A, rescue by H-, K-, and N-Ras of the inhibition on ERK2 activation caused by H-N17. COS-7 cells were co-transfected with AU5-ERK2 (1  $\mu$ g), with vector (-), and with 250 ng of HA-tagged H-N17 (+), in addition to 500 ng, of plasmids encoding FLAG-tagged H-, K- or N-Ras wild types (wt). Upon stimulation with EGF (100 ng/ml) for 5 min, kinase assays were performed in anti-AU5 immunoprecipitates, using MBP as substrate. Lower panels, protein levels of H-, K-, and N-Ras as determined by immunoblotting using specific antibodies; protein levels of HA-H-N17 and of the FLAG-tagged wild-type isoforms as indicated. The panels show the ratio of the HA/FLAG signals in a representative experiment. B, rescue by H-, K-, and N-Ras of the inhibition on ERK2 activation caused by K-N17. C, rescue by H-, K-, and N-Ras of the inhibition on ERK2 activation caused by N-N17. A-C, data show averages  $\pm$  S.E. of at least five independent experiments, relative to the MBP phosphorylation levels detected in control cells.



K-N17, and N-N17 in addition to increasing concentrations of plasmids encoding for their wild-type homologues. It was found that even at their lowest concentration, a 2-fold excess, H-, K-, and N-Ras wild types remarkably rescued the restraint exerted by their respective N17 mutants on the activation of ERK2 induced by EGF (Fig. 2). These rescues were not due to a direct activation of ERK2 by the wild-type Ras proteins, because even at their highest levels of expression, wild-type H-, K-, and N-Ras activated ERK2 very poorly (data not shown).

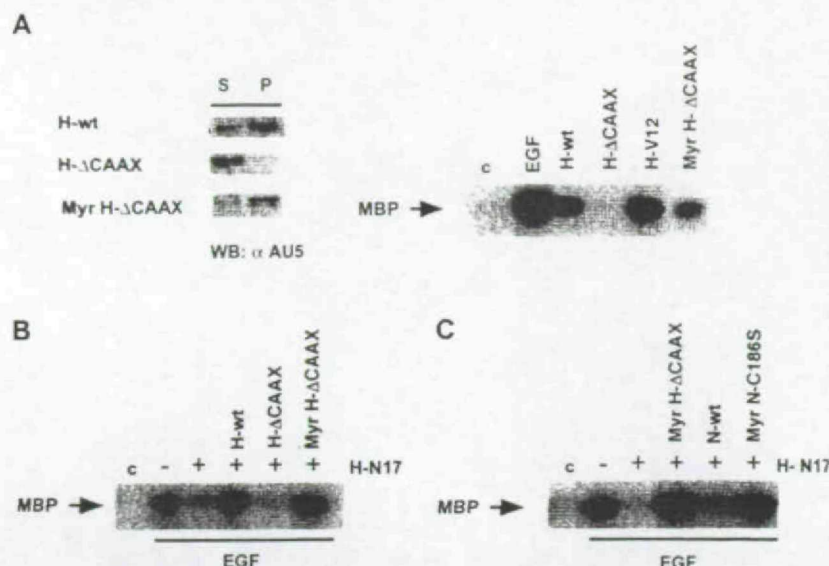
Next, we investigated whether the inhibitory effect exerted by a given Ras N17 mutant could be restored by the overexpression of any of the three wild-type Ras isoforms. For this purpose cells transfected with AU5-ERK2 were co-transfected with equal amounts of HA-tagged H-N17, K-N17, and N-N17 and of FLAG-tagged H-, K-, and N-Ras wild types. Then ERK2 activation was determined in anti-AU5 immunoprecipitates upon EGF stimulation. The rescue of the dominant negative constructs by overexpression of the wild-type proteins is likely to be a threshold effect. As such, small variations on the ratio of N17 and wild-type proteins may tip the balance between inhibition and activity. Therefore it was very important to control the relative levels of expression of the transfected wild types and inhibitory mutants in every case. Even though the different affinities exhibited by the FLAG and HA antibodies towards their respective epitopes precluded a precise compar-

ison of the concentrations of each protein, the ratio between the HA and FLAG signals was extremely valuable to monitor changes in the expression of the wild-type and the inhibitory proteins relative to each other.

Interestingly, the blockade on EGF-induced ERK2 activation brought about by H-N17 could only be effectively rescued by H-Ras, whereas K-Ras and N-Ras were solely capable of slight rescues of 12 and 16%, respectively (Fig. 3A). These differences on the rescue capabilities of each Ras isoform could not be attributed to major differences on their relative protein concentrations, because the HA/FLAG ratio was almost identical in all cases (Fig. 3A, lower panels). In a similar fashion, the inhibitory effect exerted by K-N17 could be entirely overcome by H-Ras, and K-Ras was capable of a restoration up to 79%, whereas N-Ras was completely ineffective for rescuing the activation of ERK2 (Fig. 3B). Likewise, the inhibition caused by N-N17 was fully restored by N-Ras, and up to 78% was restored by H-Ras, but it was unaffected by the expression of K-Ras (Fig. 3C). These results constituted the first evidence for differential behavior of H-, K-, and N-Ras N17 mutants on their inhibitory properties.

We moved further to examine whether the membrane attachment signal could influence the ability of a Ras isoform to overcome the inhibitory effect of its respective N17 mutant. To do so, we generated an H-Ras in which cysteine 186 was de-





**FIG. 4. Rescue by myristoylated H-Ras of the inhibition on ERK2 activation caused by H-N17.** *A, left panel,* Cellular distribution of H-Ras CAAX mutant proteins. COS-7 cells were transfected with AU5-tagged H-Ras wild type (*wt*), H-ΔCAAX, and Myr-H-ΔCAAX, lysates were fractionated as described under "Materials and Methods," and protein expression was detected by anti-AU5 immunoblotting. *Lane S*, S100 soluble fraction; *lane P*, P100 particulate fraction. *Right panel,* ERK2 activation by H-Ras CAAX mutant proteins. Kinase assays from cells co-transfected with HA-ERK2 (1  $\mu$ g), and the indicated Ras construct (500 ng, 100 ng for H-Ras V12), or stimulated with EGF (100 ng/ml) for 5 min, performed as previously described. *B,* rescue by Myr-H-ΔCAAX of the inhibition induced by H-N17. COS-7 cells were co-transfected with HA-ERK2 (1  $\mu$ g), with vector (*lanes c* and *-*) and with 250 ng of H-N17 (*lanes +*), in addition to 500 ng of plasmids encoding for the different H-Ras proteins as indicated. Upon stimulation with EGF (100 ng/ml) for 5 min, the kinase assays were performed in anti-HA immunoprecipitates, using MBP as substrate. *C,* rescue by myristoylated N-Ras of the inhibition induced by H-N17. COS-7 cells were co-transfected with HA-ERK2 (1  $\mu$ g), with vector (*lanes c* and *-*) and with 250 ng of H-N17 (*lanes +*), in addition to 500 ng, of plasmids encoding for the different Ras proteins as indicated. Upon stimulation with EGF (100 ng/ml) for 5 min, the kinase assays were performed in anti-HA immunoprecipitates, using MBP as substrate.

leted (H-ΔCAAX) and added a c-Src myristoylation signal to its N terminus (Myr-H-ΔCAAX), in addition to an AU5 tag to facilitate its detection. We thereby substituted a farnesylation/palmitoylation with a myristoylation/palmitoylation post-translational modification, both of which are effective membrane anchors (43). As shown in Fig. 4A (*left panel*), although H-ΔCAAX upon losing its farnesylation site was solubilized and appeared exclusively in the cellular soluble fraction, Myr-H-ΔCAAX was mainly localized in the particulate fraction. As such, Myr-H-ΔCAAX could induce a slight activation of ERK2, comparable with that elicited by H-Ras wild type. On the other hand, H-ΔCAAX was incapable of activating ERK2 to any extent (Fig. 4A, *right panel*). When we tested the ability of these constructs to rescue the inhibition exerted by H-N17 on ERK2 activation by EGF, it was found that Myr-H-ΔCAAX was as competent as wild-type H-Ras for overcoming the blockade brought about by H-N17. On the other hand, H-ΔCAAX was completely ineffective (Fig. 4B). Therefore, our results indicated that myristoylated Ras proteins were as efficient as farnesylated forms for overcoming the repressing effects of Ras dominant inhibitory mutants. In light of this result, we asked whether the substitution of the farnesyl by a myristoyl post-translational modification could render other Ras isoforms competent for rescuing the inhibitory effects of H-N17. To do so, we added a c-Src myristoylation signal to the N terminus of a farnesylation-deficient N-Ras in which cysteine 186 was substituted by serine (Myr N-C186S). It was found that although wild-type N-Ras was only capable of a minor rescue on the inhibitory effect exerted by H-N17 on EGF-induced ERK2 activation, Myr N-C186S, which slightly activated ERK2 *per se* (data not shown), could significantly overcome H-N17 inhibition, although not as effectively as Myr-H-ΔCAAX (Fig. 4C).

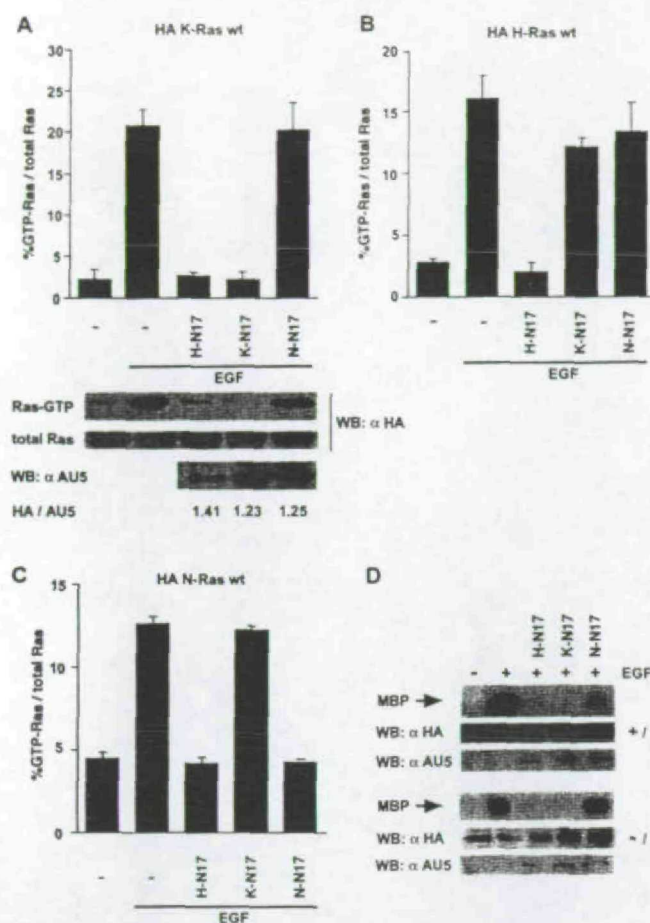
It was of the utmost importance to determine to what extent each of the Ras dominant inhibitory mutants could inhibit the activation of three Ras isoforms. For this purpose, we examined how AU5-tagged H-N17, K-N17, and N-N17 interfered with the

GDP/GTP exchange induced by EGF on HA-tagged H-, K-, and N-Ras, when transfected in COS-7 cells. These analyses were performed by the GTP-Ras pull-down assay, using Raf Ras-binding domain fused to GST (44). Surprisingly, it was found that the nucleotide exchange induced by EGF on K-Ras was completely blocked by H-N17 and K-N17 but was unaffected by N-N17 (Fig. 5A), even though N-N17 was expressed at levels comparable with those of H-N17 and K-N17, and the wild type and N17 relative concentrations, assessed by the HA/AU5 signals ratio, were similar in all instances (Fig. 5A, *lower panels*). On the other hand, the activation of H-Ras was potently suppressed by H-N17, whereas K-N17 caused a 22% inhibition, and N-N17 reduced its nucleotide exchange merely by 16% (Fig. 5B). In a similar fashion, GDP/GTP exchange on N-Ras induced by EGF was inhibited by H-N17 and N-N17 down to basal levels, but under the same experimental setting K-N17 had no detectable effects (Fig. 5C).

Based on the results described above, because N-N17 interfered with the EGF signal by specifically inhibiting the activation of N-Ras without significantly affecting K-Ras and very slightly H-Ras, it would be conceivable that in the absence of an endogenous N-Ras, the ability of N-N17 to down-regulate EGF-induced ERK2 activation would be severely impaired. Therefore, we further ascertained the specificity range of the N-N17 mutant in N-Ras-null MEFs (20). MEFs obtained from N-Ras knock-out mice (*-/-*) and from wild-type littermates (*+/+*) were transiently co-transfected with HA-ERK2 and with the AU5-tagged H-N17, K-N17, and N-N17 mutants, and ERK2 activation was determined upon stimulation with EGF. In N-Ras *-/-* MEFs, all three inhibitory mutants were capable of reducing the EGF-induced ERK2 activation, with K-N17 causing the greatest repression. However, in N-Ras *-/-* MEFs, N-N17 was completely inefficient for down-regulating the activity of ERK2 (Fig. 5D), providing a further demonstration that N-N17 inhibitory effects are primarily mediated by N-Ras.

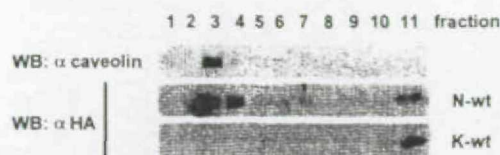
It was conceivable that the distinct inhibitory specificities





**FIG. 5. Inhibition of nucleotide exchange on Ras isoforms by H-, K-, and N-Ras N17 mutants.** A, inhibition of nucleotide exchange on K-Ras by H-N17, K-N17, and N-N17. Ras GTP loading was determined as described under "Materials and Methods" upon treatment with EGF (100 ng/ml) for 5 min where indicated, in COS-7 cells co-transfected with HA-K-Ras (250 ng) in the presence of vector (-) or of H-N17, K-N17, and N-N17 (250 ng of each) as shown. Upper panel, HA-K-Ras-GTP levels from a representative experiment, as determined by anti-HA-immunoblotting in affinity precipitates using GST-Raf-Ras-binding domain as bait. Middle panel, total input, K-Ras levels as determined by anti-HA-immunoblotting in total lysates. Lower panel, protein levels of AU5-tagged H-N17, K-N17, and N-N17 as determined by anti-AU5 immunoblotting. The numbers show the ratio of the HA/AU5 signals in a representative experiment. B, inhibition of nucleotide exchange on H-Ras by H-N17, K-N17, and N-N17. The values were determined as described above. C, inhibition of nucleotide exchange on N-Ras by H-N17, K-N17, and N-N17. A-C, data show averages  $\pm$  S.E. of at least five independent experiments. D, effects of Ras inhibitory mutants on EGF-induced ERK2 activation in N-Ras-null MEFs. MEFs from N-Ras-null mice (-/-) and wild-type littermates (+/+) were transiently co-transfected with HA-ERK2 (1  $\mu$ g) and AU5-tagged H-N17, K-N17, and N-N17 (250 ng of each). Upon stimulation with EGF (100 ng/ml) for 5 min where indicated (+), kinase assays were performed as previously described. Lower panels, protein levels of HA-ERK2 and AU5-tagged inhibitory mutants as determined by immunoblotting using anti-HA and AU5-specific antibodies, respectively. WB, Western blot.

exhibited by H-, K-, and N-Ras dominant interfering mutants guarded some relationship with the pattern of distribution of the three Ras isoforms in different plasma membrane microdomains. The compartmentalization of H-Ras and K-Ras is well documented, whereas H-Ras is mainly found in lipid rafts, both caveolar and noncaveolar. K-Ras is present in the bulk, disordered membrane (26, 27, 31, 45). However, a detailed study on N-Ras cellular distribution is still missing. As a first approach to ascertain the nature of the plasma membrane microlocations where N-Ras was positioned, we carried out a Triton X-100



**FIG. 6. Association of N-Ras to lipid rafts.** COS-7 cells were transfected with HA-tagged K-Ras and N-Ras. Cells solubilized in 0.250% Triton X-100 were partitioned in a sucrose gradient as described under "Materials and Methods." The presence of the Ras isoforms in the different fractions was analyzed by anti-HA immunoblotting. Anti-caveolin-1 immunoblotting identifies the lipid raft fractions. WB, Western blot; wt, wild type.

solubility test to assay for lipid raft association, because lipid rafts are insoluble in this detergent (26). As such, COS-7 cells were transfected with HA-tagged K-Ras and N-Ras, and their solubility in 0.25% Triton X-100 was determined. As shown in Fig. 6, after resolution in a sucrose gradient, 75–80% of N-Ras was detected in the same fractions as caveolin-1, a marker for lipid rafts. On the other hand, K-Ras was completely solubilized in 0.25% Triton and appeared in the denser fractions, thereby demonstrating a prominent association of N-Ras to lipid rafts.

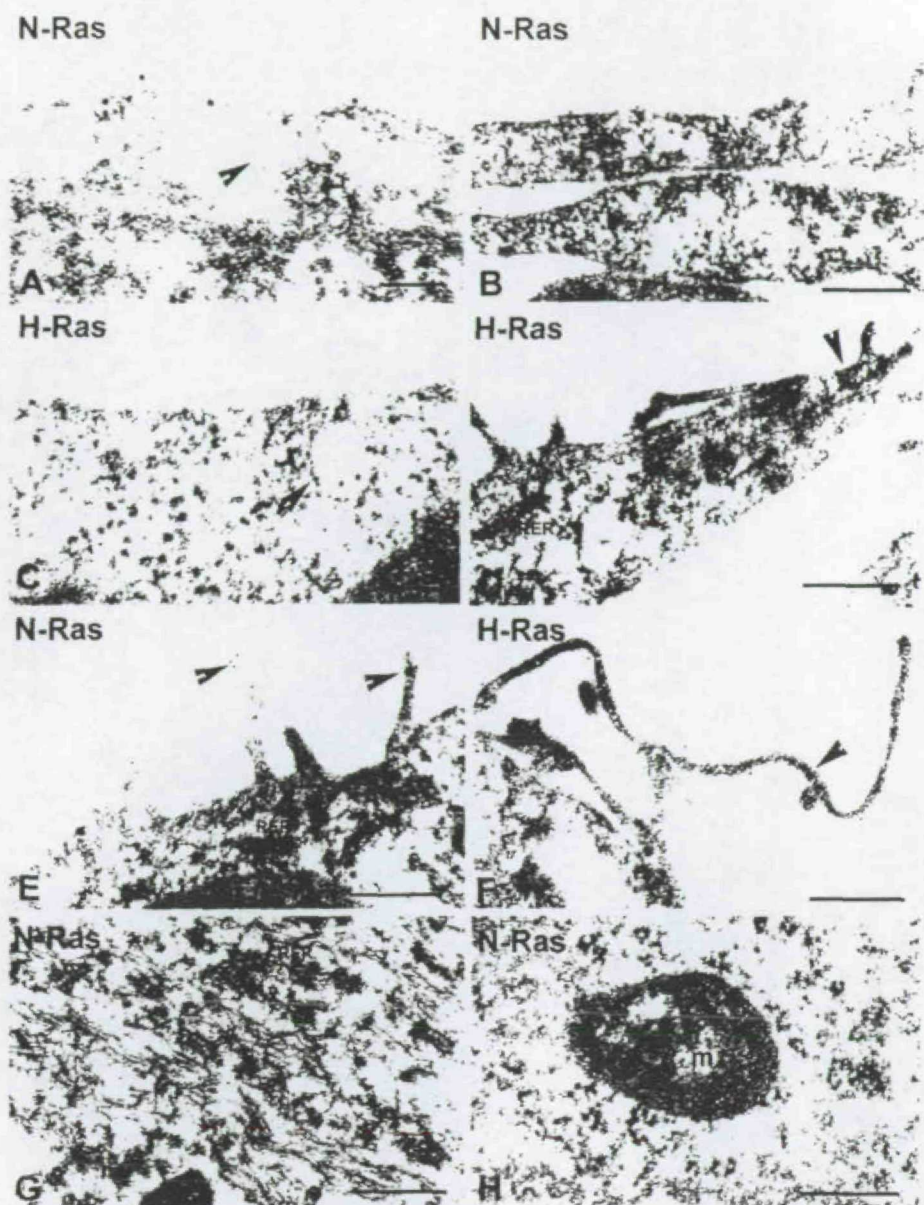
To undertake in further detail the ultrastructural analysis of N-Ras distribution, MDCK cells were transfected with constructs encoding green fluorescent protein (GFP) with N-Ras or N-Ras hypervariable region (amino acids 163–189) fused to its C terminus and examined using immunogold electron microscopy with antibodies that recognize the GFP tag. To avoid artifactual localizations caused by overexpression, low levels of expression were chosen, that is, cultures in which Western blotting showed a clear anti-GFP signal but in which an anti-N-Ras signal did not reach a 2-fold increase over the endogenous N-Ras levels (data not shown). GFP-N-Ras was clearly localized in electron-dense areas on the plasma membrane, both at the cell body and tapered cellular processes (Fig. 7, A and B). However, no specific labeling was detectable in caveolae (Fig. 7A, arrow), whereas in cells transfected with GFP-H-Ras, H-Ras was clearly visible in caveolar membranes (Fig. 7C, arrow). The comparative analysis of the subcellular distribution of GFP-N-Ras and GFP-H-Ras showed that both fusion proteins were detectable on electron-dense areas of the plasma membrane. Interesting, a high density of gold particles was found on the membrane domains that formed the boundary of filopodia (Fig. 7, D–F, arrows). Like GFP-N-Ras, some scattered gold particles of GFP-H-Ras decorated the cytosol in areas rich in intermediate filaments, but in either case, no labeling was observed on rough endoplasmic reticulum membranes (Fig. 7, D and G). Within the cytoplasm, gold particles of GFP-N-Ras immunoreactivity were mainly distributed on the mitochondria (Fig. 7H) and particularly in areas enriched in intermediate filament bundles (Fig. 7G, if). No differences in localization were detected when using GFP-N-Ras hypervariable region when compared with GFP-N-Ras (data not shown).

In light of our data, we proceeded to use H-, K-, and N-Ras inhibitory mutants as tools to investigate how the signals induced by various stimuli and GEFs, resulting in the activation of ERK2, were affected by the differential blockade on the total Ras output. As such, NIH3T3 cells were transiently co-transfected with HA-ERK2 and with the H-N17, K-N17, and N-N17 mutants and stimulated with PDGF or with LPA. As shown in Fig. 8A, the activation of ERK2 by PDGF was markedly down-regulated by H-N17 and K-N17 but not by N-N17 (Fig. 8A). On the other hand, all three inhibitory mutants could repress the LPA-induced activation of ERK2, of which K-N17 caused the largest suppression.

In the same fashion, we finally investigated the effects of the



**FIG. 7. Immunogold electron microscopy localization of GFP-N-Ras in MDCK cells using antibodies against GFP and a secondary antibody conjugated with 10 nm gold particles.** Specific labeling of GFP-N-Ras is observed on electron-dense areas of the plasma membrane (A and B). Caveolae (arrowhead in A) appear free of labeling. Conversely, GFP-H-Ras was clearly present in caveola (arrowhead in C). Note in D the high concentration of H-Ras gold labeling on the tip of a cellular process (arrowhead in D). Both GFP-N-Ras and GFP-H-Ras were clearly distributed on the plasma membrane with a higher concentration detected on the membrane of filopodia (E and F). In the cytoplasm, a few gold particles of N-Ras immunoreactivity decorated the cytosol, in areas occupied by intermediate filaments (G, *if*). Gold particles also decorated the mitochondrial matrix (M). There was a negligible labeling on the rough endoplasmic reticulum (RER) (D, E, and G). Scale bars, 100 nm in A and C; 300 nm for the rest.



Ras inhibitory mutants in the stimulation of ERK2 by Ras-activating GEFs. To do so, COS-7 cells were co-transfected with HA-ERK2 and the H-N17, K-N17, and N-N17 mutants, in addition to the different GEFs to be tested. Activation of ERK2 by SOS1 was equally blocked by the three inhibitory mutants (Fig. 8B). ERK2 activation by Ras-GRF1 was only repressed by H-N17 but was unaffected by K-N17 and N-N17. A similar situation was observed with Ras-GRF2, but in this case, K-N17 and N-N17 were capable of inducing a noticeable inhibition on ERK2 activation. Interestingly, the stimulatory effects of the Ras exchange factor Cal-DAG I on the activation of ERK2 were completely unaffected by H-N17, K-N17, and N-N17. Conversely, Cal-DAG II behaved similarly to SOS1: its ability to activate ERK2 was equally blocked by the three Ras inhibitory mutants. On the other hand, ERK2 activation by Cal-DAG III was markedly inhibited by H-N17 and to a lesser extent by K-N17 and N-N17. Overall, our results clearly indicated that H-, K-, and N-Ras N17 mutants had distinct inhibitory effects over most of the Ras-activating GEFs described thus far.

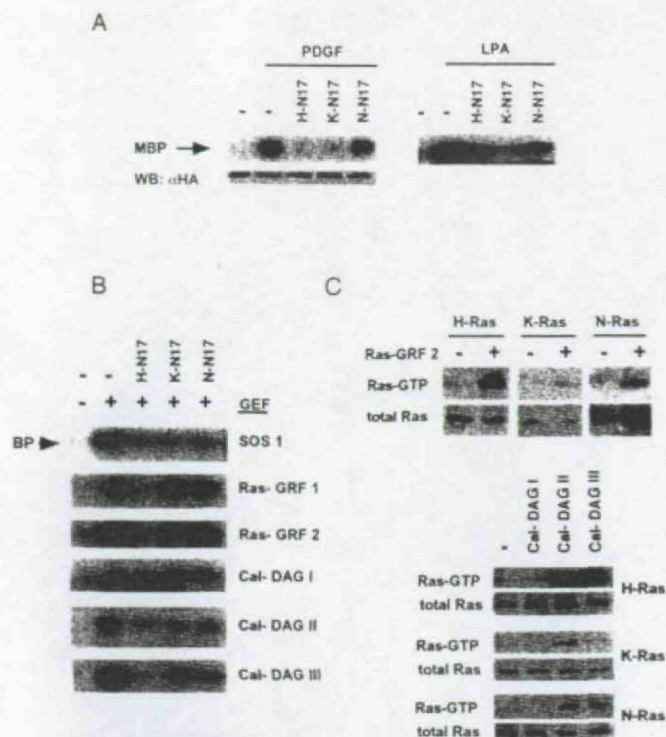
To enable us a better interpretation of these results, we ascertained the ability of the different GEFs to stimulate guanine nucleotide exchange on the three Ras isoforms. In full agreement

with previous results (15, 29), we found that SOS induced exchange on the three Ras isoforms, and Ras-GRF1 was active solely over H-Ras (data not show). On the other hand, Ras-GRF2 induced a potent GDP/GTP exchange on H-Ras and to a lesser extent on N-Ras and K-Ras (Fig. 8C). In the case of the CAL-DAG family, CAL-DAG II could stimulate a remarkable nucleotide exchange on the three isoforms. On the other hand, CAL-DAG III catalyzed GDP/GTP replacement to a different degree in the three Ras proteins, being most active on H-Ras and least over K-Ras. By contrast, CAL-DAG I was incapable of inducing exchange on any of the three Ras isoforms.

#### DISCUSSION

In this study we have investigated the inhibitory specificities that H-Ras, K-Ras4B, and N-Ras N17 dominant inhibitory mutants exhibit toward the activation of the wild-type Ras isoforms. We have found that H-N17, K-N17, and N-N17 display remarkable differences in their ability to inhibit the activation of ERK2 and the nucleotide exchange on H-Ras, K-Ras4B, and N-Ras, induced by EGF. A straightforward explanation for these variations would be that the three Ras dominant inhibitory mutants possess different affinities toward

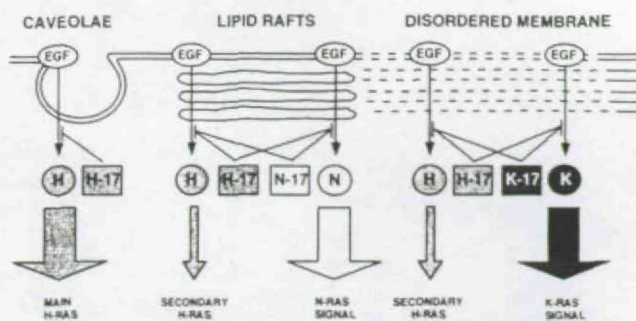




**FIG. 8. Effects of Ras inhibitory mutants on ERK2 activation induced by mitogenic stimuli and Ras-activating GEFs.** A, effects of Ras inhibitory mutants on the activation of ERK2 induced by mitogens. NIH3T3 cells were transiently transfected with HA-ERK2 (1  $\mu$ g) and with AU5-tagged H-N17, K-N17, and N-N17 (250 ng of each). Upon stimulation with PDGF (10 ng/ml) or with LPA (10  $\mu$ M) for 5 min where indicated, kinase assays were performed as previously described. Lower panel, protein levels of HA-ERK2 as determined by immunoblotting using an HA-specific antibody. B, effects of Ras inhibitory mutants on the activation of ERK2 induced by Ras-activating GEFs. COS-7 cells were transiently transfected with HA-ERK2 (1  $\mu$ g) and with AU5-tagged H-N17, K-N17, and N-N17 (250 ng of each), in addition to the different GEFs (0.5  $\mu$ g), where indicated (+). The kinase assays were performed as previously described. C, GDP/GTP exchange induced on H-, K-, and N-Ras by Ras-activating GEFs. Ras GTP loading was determined as described under "Materials and Methods," in COS7 cells transfected with the indicated GEFs (0.5  $\mu$ g) and the HA-tagged Ras isoforms (1  $\mu$ g) as shown. WB, Western blot.

the GEFs activated by EGF. Of all the Ras-activating GEFs described up to date, only SOS 1-2 and Ras-GRF2 are ubiquitously expressed (46, 47). In the experimental model utilized in this study, COS-7 cells, we have not detected expression of Ras-GRF2.<sup>2</sup> Furthermore, Ras-GRF2 is essentially activated by G-protein-coupled receptors, not by the tyrosine kinase type, like the EGF receptor (47). Therefore, it is predictable that the EGF-induced events described herein are mainly mediated by SOS, notwithstanding the participation of other, as yet unidentified GEFs.

To the best of our knowledge, a comparative study on the binding affinities that SOS exhibits toward H-, K-, and N-Ras has not been reported. However, major differences are not to be expected. First, regarding the structure, the resolution of the SOS-Ras complex has revealed that the residues in Ras that determine the binding to SOS are highly conserved among H-, K-, and N-Ras (48). Second, any existing differences on the binding affinities of SOS and the three Ras isoforms would be reflected by the efficiency with which SOS stimulates nucleotide exchange in H-, K-, and N-Ras *in vitro*. As such, it is known that SOS induces GDP/GTP exchange on the three isoforms in the hierarchy H-Ras > N-Ras > K-Ras (29). However, the



**FIG. 9. Model for Ras dominant inhibitory mutants effects on different plasma membrane microlocations.** H-Ras would be present in caveolae, in noncaveolar lipid rafts where it would co-localize with N-Ras, and in disordered plasma membrane in addition to K-Ras. As such, H-N17 would be present in all of these microlocations. K-N17 presence would be restricted to bulk membrane, and N-N17 would be solely found in lipid rafts. Therefore, H-N17 would block the activation of H-Ras main signal in caveolae, the activation of an H-Ras secondary signal and of N-Ras in rafts, and the activation of another H-Ras secondary signal and of K-Ras in bulk membrane. On the other hand, K-N17 inhibitory effect would be restricted to the bulk membrane, where it would block the secondary H-Ras-mediated component and the K-Ras signal. Likewise, N-N17 would inhibit the activation of its wild-type counterpart and the activation of the H-Ras component that occurs in lipid rafts.

recorded variations in the nucleotide replacement induced by SOS on the different Ras isoforms are small.<sup>3</sup> This also occurs for other GEFs such as Ras-GRF1. In this case, differences on its exchange potential do not even reach 2-fold between any two Ras isoforms (49). In light of these considerations, it is unlikely that distinct GEF binding affinities can account for the dramatic differences that H-, K-, and N-Ras N17 mutants display in their capacity to inhibit Ras functions in EGF-induced episodes.

An alternative explanation could be found in the recently reported compartmentalization of Ras proteins in distinct plasma membrane domains (25). It has been shown that H-Ras is distributed approximately equally in caveolar and noncaveolar lipid rafts and bulk plasma membrane. On the other hand, K-Ras is localized predominantly in nonraft bulk membrane (26, 31, 45). A recent report also localizes K-Ras in caveolae (27). However, this last conclusion is reached by co-localization with caveolin using confocal microscopy, as opposed to the previous studies that utilize electron microscopy. It is debatable whether confocal microscopy can offer the necessary resolution to discriminate accurately between caveolae and contiguous bulk membrane. Herein, we present for the first time the ultrastructural localization of N-Ras. We have found that N-Ras is mainly present in lipid rafts, in agreement with other investigators.<sup>3</sup> However, we have not detected N-Ras in caveolae, in contradiction to a previous report using confocal microscopy (27). Our results indicate that N-Ras also co-localizes with H-Ras in the membrane and tips of cellular prolongations and filopodia. We have also detected N-Ras in mitochondria, in consonance with previous reports (50), something that may be directly related to the steady-state antiapoptotic signal generated by N-Ras (51). Interestingly, some N-Ras co-localizes in the cytoplasm with intermediate filaments, a connection unprecedented thus far. It is likely that the N-Ras associated with mitochondria and intermediate filaments accounts for the portion of N-Ras, about 20%, detected in the last fractions of the sucrose gradients.

Basing ourselves in the above mentioned distribution of the three Ras isoforms in distinct plasma membrane microdo-

<sup>2</sup> I. Arozarena and P. Crespo, unpublished results.

<sup>3</sup> J. F. Hancock, personal communication.



mains, we propose the model depicted in Fig. 9 to explain our results on the inhibitory properties of H-, K-, and N-Ras N17 dominant inhibitory mutants. As discussed before, H-Ras is present in caveolae, in noncaveolar lipid rafts where it co-localizes with N-Ras, and in the disordered, bulk plasma membrane where it co-exists with K-Ras. Therefore, it would be conceivable to find H-N17 in all these compartments. On the other hand, the presence of K-N17 would be restricted to bulk membrane, and N-N17 would be solely found in lipid rafts. Although H-Ras is equally present in the three membrane microdomains, there is evidence suggesting that H-Ras activation takes place primarily in caveolae (26, 45, 52–54). Even though the main H-Ras signal may originate in caveolae, the presence of H-Ras in rafts and bulk membrane makes it conceivable that secondary, less intense H-Ras-mediated signals can also arise in these locations, where the respective N-Ras and K-Ras activation takes place as well.

As such, H-N17 would block the activation of H-Ras main signal in caveolae, the activation of an H-Ras secondary signal and of N-Ras in rafts, and the activation of another H-Ras secondary signal and of K-Ras in bulk membrane. This agrees with our data demonstrating that inhibition by H-N17 is greatly rescued by the overexpression of H-Ras wild type, which restitutes the H-Ras signal in all locations. Conversely, H-N17 inhibition is only slightly rescued by K-Ras (12%), which partially restores the EGF-induced signal generated in bulk membrane, and by N-Ras (16%), which can only re-establish the signal in lipid rafts. On the other hand, K-N17 completely inhibits the activation of K-Ras and partially blocks H-Ras activation (22%), because it can only interfere with the H-Ras-mediated component that originates in bulk membrane. Because K-N17 is not present in lipid rafts, it does not affect N-Ras activation whatsoever. Accordingly, because the K-N17 inhibitory effect is restricted to the bulk membrane, it can be rescued by the overexpression of the Ras isoforms that are located therein, H-Ras and K-Ras itself, as our data demonstrate. Likewise, N-N17 completely inhibits the activation of its wild-type counterpart and blocks the activation of the H-Ras component that operates in lipid rafts (16%). In agreement, we show that the overexpression of wild-type H-Ras and of N-Ras counteracts N-N17 inhibitory effect, which takes place solely in lipid rafts. Because N-N17 is not present in bulk membrane, it does not affect K-Ras activation. Overall, this model reconciles our results about the inhibitory properties of Ras dominant interfering mutants, with the present knowledge on the compartmentalization of Ras isoforms. These data, obtained in COS-7 cells, are strongly validated by our experiments in N-Ras-null fibroblast. In this cellular setting, we demonstrate that the absence of endogenous N-Ras severely precludes N-N17 inhibitory effects, without affecting those of H-N17 and K-N17.

Our results also indicate that the substitution of the farnesyl anchor for a myristoylation signal in H-Ras does not affect the ability of the resulting myristoylated/palmitoylated H-Ras to rescue the inhibitory effect elicited by H-N17. Interestingly, switching the farnesyl anchor for a myristoylation signal also potentiates the competence of N-Ras for counteracting the inhibition exerted by H-Ras N17. A likely explanation for these phenomena is provided by recent reports indicating that myristoylated H-Ras is distributed through the plasma membrane in a similar way to wild-type H-Ras (29). Thus, it is conceivable that myristoylation would alter N-Ras location within the membrane and augment its concentration at sites where it co-localizes with H-Ras, thereby enabling it to counterbalance H-N17 inhibitory effects.

Having established the specificity range for H-, K-, and

N-Ras dominant inhibitory mutants, we have used them as tools to investigate the relative contribution of their wild-type counterparts to the signals generated by a series of mitogenic stimuli driven through different types of membrane receptors. The use of these mutants would also be extremely helpful for identifying the plasma membrane compartment in which these signals are generated. We have shown that the activation of ERK2 by EGF is inhibited by the three Ras inhibitory mutants, but to different extent: almost total inhibition by H-N17, 88% repression by K-N17, and 55% inhibition by N-N17. Because the inhibition brought about by H-N17 results from blocking the signals generated in caveolae, rafts, and bulk membrane, whereas the repression by K-N17 is solely due to the inhibition of the bulk membrane-originated signal, this would suggest that K-Ras is the main Ras isoform conveying the EGF signal to the ERKs cascade. A similar situation is observed in the case of PDGF, which is equally inhibited by H-N17 and K-N17 but is largely unaffected by N-N17, in consonance with previous results indicating that PDGF signals are not efficiently conveyed by N-Ras (55). The prevalence of the bulk membrane K-Ras component is also remarkable in the case of the activation of ERK2 stimulated by LPA, which is repressed most potently by K-N17.

In a similar fashion, we have utilized H-, K-, and N-Ras dominant inhibitory mutants to give us an insight into the sites of action and isoform specificity displayed *in vivo* by most Ras-activating GEFs described thus far. As such, our data show that the activation of ERK2 by Ras-GRF1 is inhibited by H-N17 but is completely unaffected by K-N17 and N-N17. This result indicates that Ras-GRF1 can only signal through H-Ras, in perfect agreement with previous results showing that, *in vivo*, Ras-GRF1 induces GDP/GTP exchange in H-Ras but not in K-Ras nor in N-Ras (15). A similar situation is observed for Ras-GRF2; only in this case, K-N17 and N-N17 can slightly diminish the signal elicited by this GEF. These results could be interpreted as Ras-GRF1 inducing the activation of H-Ras solely in caveolae, whereas Ras-GRF2 would be capable of activating, to a lesser extent, the lipid rafts and bulk membrane components of the total Ras signal. Indeed, we demonstrate that Ras-GRF2 is capable of stimulating GDP/GTP exchange on N-Ras and on K-Ras, although at lower levels than on H-Ras.

In the case of CAL-DAG III, its potential to activate ERK2 is remarkably inhibited by H-N17, and to a lesser extent by K-N17 and N-N17, thereby pointing to the H-Ras/caveolar component as the main route used by this GEF for activating ERK2. Also in the case of this GEF, the effects exhibited by the Ras inhibitory mutants on its function match closely its affinity for the three Ras isoforms as demonstrated by *in vivo* exchange assays. As such, we show that CAL-DAG III is primarily active on H-Ras and exhibits weaker exchange activities on N-Ras and K-Ras.

Particularly intriguing situations are those detected for SOS1 and CAL-DAG II, in these two cases, the three N17 mutants suppress ERK2 activation with similar efficiency. This was unexpected because, in light of our model, if the signals generated in caveolae, rafts, and bulk membrane were equal, H-N17 would be expected to exert a greater inhibition than the other two N17 mutants. Although we do not have a precise answer for this phenomenon, one possible explanation could be that the expression levels of these GEFs are high enough as to overcome the inhibitory effects of the N17 mutants in all locations. A second possibility would be that the Ras dominant inhibitory mutants completely suppress the activation of ERK2 brought about by the total Ras component and the residual activation being due to the stimulation by SOS or



CAL-DAG II of an ERK-activating pathway mediated by another GTPase. Indeed, both SOS and CAL-DAG II can stimulate nucleotide exchange on M-Ras, and CAL-DAG II is also active over TC21 (56). A similar situation may be occurring in the case of CAL-DAG I. We and others (16) have demonstrated that this GEF cannot induce nucleotide exchange on any of the three Ras isoforms. Nevertheless, our results clearly show that CAL-DAG I can induce a potent ERK2 activation that is insensitive to inhibition by H-N17, K-N17, and N-N17. Because CAL-DAG I is an effective GEF for Rap-1 (16), it is likely that CAL-DAG I may be activating ERK2 through a Rap > B-Raf > MEK pathway, independently of Ras.

In summary, our data clearly indicate that, regardless of the fact that the three Ras isoforms share most known GEFs, the inhibitory spectra of H-, K-, and N-Ras N17 dominant inhibitory mutants are remarkably different. Furthermore, we show that the inhibitory specificities displayed by these mutants can be reasonably explained in view of the recent findings on the compartmentalization of Ras proteins in distinct membrane microdomains. This situation may find a precedent in the case of Rho family GTPases. It is now well known that most Dbl family GEFs are active on Rho, Rac, and Cdc42 (35). However, the widespread use of Rho, Rac, and Cdc42 dominant inhibitory mutants has yielded remarkably specific inhibitions. In light of our findings, it is likely that this specificity is also based to a great extent on the microlocalization of each Rho family member. As is the case for the Rho GTPases dominant inhibitory mutants, our results provide the basis for H-, K-, and N-Ras dominant inhibitory mutants to become useful tools for further investigating Ras functions and the differences among H-Ras, K-Ras, and N-Ras.

**Acknowledgments**—We thank Drs. M. Matsuda, J. C. Stone, and M. F. Moran for providing us with reagents, Dr. J. F. Hancock for sharing unpublished information, Drs. Alfred Wittinghofer and Javier León for helpful discussions, and Salvador Aznar for technical assistance.

## REFERENCES

- Malumbres, M., and Pellicer, A. (1998) *Fronts. Biosci.* **3**, 887–912
- Crespo, P., and Leon, J. (2000) *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 1613–1636
- Lowy, D. R., and Willumsem, B. M. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 851–891
- Willumsem, B. M., Christensen, A., Hubbert, N. L., Papageorge, A. G., and Lowy, D. R. (1984) *Nature* **310**, 583–586
- Hancock, J. F., Magee, A. L., Childs, J. E., and Marshall, C. J. (1989) *Cell* **57**, 1167–1177
- Hancock, J. F., Paterson, H., and Marshall, C. J. (1990) *Cell* **63**, 133–139
- Hancock, J. F., Cadwallader, K., Paterson, H., and Marshall, C. J. (1991) *EMBO J.* **10**, 4033–4039
- Leon, J., Guerrero, I., and Pellicer, A. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 1535–1540
- Fiorucci, G., and Hall, A. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **950**, 81–83
- Muller, R., Slamon, D. J., Adamson, E. J., Tremblay, J. M., Muller, D., Cline, M. J., and Verma, I. M. (1983) *Mol. Cell. Biol.* **3**, 1062–1069
- Bos, J. L. (1989) *Cancer Res.* **49**, 4682–4689
- Rodenhuis, S. (1992) *Semin. Cancer Biol.* **3**, 241–247
- Maher, J., Baker, D. A., Manning, M., Dibb, N. J., and Roberts, I. A. G. (1995) *Oncogene* **11**, 1639–1647
- Bollag, G., and McCormick, F. (1991) *Nature* **351**, 576–579
- Jones, M. K., and Jackson, J. H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 1782–1787
- Clyde-Smith, J., Silins, G., Gartside, M., Grimmond, S., Etheridge, M., Apolloni, A., Hayward, N., and Hancock, J. F. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 32260–32267
- Yan, J., Roy, S., Apolloni, A., Lane, A., and Hancock, J. F. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 24052–24056
- Voice, J. K., Klemke, R. I., Le, A., and Jackson, J. H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 17164–17170
- Walsh, A. M., and Bar-Sagi, D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 15609–15615
- Umanoff, H., Edelman, W., Pellicer, A., and Kucherlapati, R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 1709–1713
- Ise, K., Nakamura, K., Nakao, K., Shimizu, S., Harada, H., Ichise, T., Miyoshi, J., Gondo, Y., Ishikawa, T., Aiba, A., and Katsuki, M. (2000) *Oncogene* **19**, 2951–2956
- Esteban, L. M., Vicario-Arbejon, C., Fernandez-Salguero, P., Fernandez-Melarde, A., Swaminathan, N., Yienger, K., Lopez, E., McKay, R., Ward, J. M., Pellicer, A., and Santos, E. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1444–1452
- Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, M. T., Umanoff, H., Edelman, W., Kucherlapati, R., and Jacks, T. (1997) *Genes Dev.* **11**, 2468–2481
- Koera, K., Nakamura, K., Nakao, K., Miyoshi, J., Toyoshima, K., Hatta, T., Otani, H., Aiba, A., and Katsuki, M. (1997) *Oncogene* **15**, 1151–1159
- Prior, I. A., and Hancock, J. F. (2001) *J. Cell Sci.* **114**, 1603–1608
- Prior, I. A., Harding, A., Yan, J., Sluimer, J., Parton, R. G., and Hancock, J. F. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, 368–375
- Kranenburg, O., Verlaan, L., and Moolenaar, W. H. (2001) *Curr. Biol.* **11**, 1880–1884
- Welman, A., and Burger, M. M. (2000) *Oncogene* **19**, 4582–4591
- Jaumot, M., Yan, J., Clyde-Smith, J., Sluimer, J., and Hancock, J. F. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 272–278
- Choy, E., Chiu, V. K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I. E., and Phillips, M. R. (1999) *Cell* **98**, 69–80
- Apolloni, A., Prior, I. A., Lindsay, M., Parton, R. G., and Hancock, J. F. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2475–2487
- Feig, L. A. (1999) *Nat. Cell Biol.* **1**, 25–27
- Sigal, I., Gibbs, J. B., D'Alonzo, J. S., Temeles, G. H., Wolanski, B. S., Socher, S. H., and Scolnick, E. M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 952–956
- Feig, L. A., and Cooper, G. M. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3235–3243
- Whitehead, I. P., Campbell, S., Rossmann, K. L., and Der, C. J. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1332**, F1–F23
- Coso, O. A., Chiariello, M., Yu, J. C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., and Gutkind, J. S. (1995) *Cell* **81**, 1137–1146
- Arozarena, I., Aaronson, D. S., Matallanas, D., Sanz, V., Ajenjo, N., Tenbaum, S., Teramoto, H., Ighishi, T., Zabala, J. C., Gutkind, J. S., and Crespo, P. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 26441–26448
- Ajenjo, N., Aaronson, D. S., Ceballos, E., Richard, C., Leon, J., and Crespo, P. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 7189–7197
- Arozarena, I., Matallanas, D., and Crespo, P. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 21878–21884
- Kamata, T., and Feramisco, J. R. (1984) *Nature* **310**, 147–150
- Crespo, P., Xu, N., Simonds, W. F., and Gutkind, J. S. (1994) *Nature* **369**, 418–420
- Stacey, D. W., Feig, L. A., and Gibbs, J. A. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4053–4064
- Cadwallader, K. A., Paterson, H., MacDonald, S. G., and Hancock, J. F. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4722–4730
- Taylor, S. J., and Shalloway, D. (1996) *Curr. Biol.* **6**, 1621–1627
- Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J. F., and Parton, R. G. (1999) *Nat. Cell Biol.* **1**, 98–105
- Botwell, D., Fu, P., Simon, M., and Senior, P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 6511–6515
- Fan, N. P., Fan, W., Wang, Z., Zhang, L., Chen, H., and Moran, F. M. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1396–1406
- Boriack-Sjodin, P. A., Margarit, S. M., Bar-Sagi, D., and Kuriyan, J. (1998) *Nature* **394**, 337–343
- Lenzen, C., Cool, R. H., Prinz, H., Kuhlman, J., and Wittinghofer, A. (1998) *Biochemistry* **37**, 7420–7430
- Rebollo, A., Perez-Sala, D., and Martinez-Arias, C. (1999) *Oncogene* **18**, 4930–4939
- Wolfman, J. C., and Wolfman, A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 19315–19323
- Mineo, C., James, G. L., Smart, E. J., and Anderson, R. G. W. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 11930–11935
- Liu, P., Ying, Y., Ko, Y., and Anderson, R. G. W. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10299–10303
- Liu, P., Ying, Y., and Anderson, R. G. W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13666–13670
- Wakelam, M. J., Davies, S. A., Houslay, M. D., McKay, I., Marshall, C. J., and Hall, A. (1986) *Nature* **323**, 173–176
- Ohba, Y., Mochizuki, N., Yamashita, S., Chan, A. M., Schrader, J. W., Hattori, S., Nagashima, K., and Matsuda, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 20020–20026